



KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH GmbH

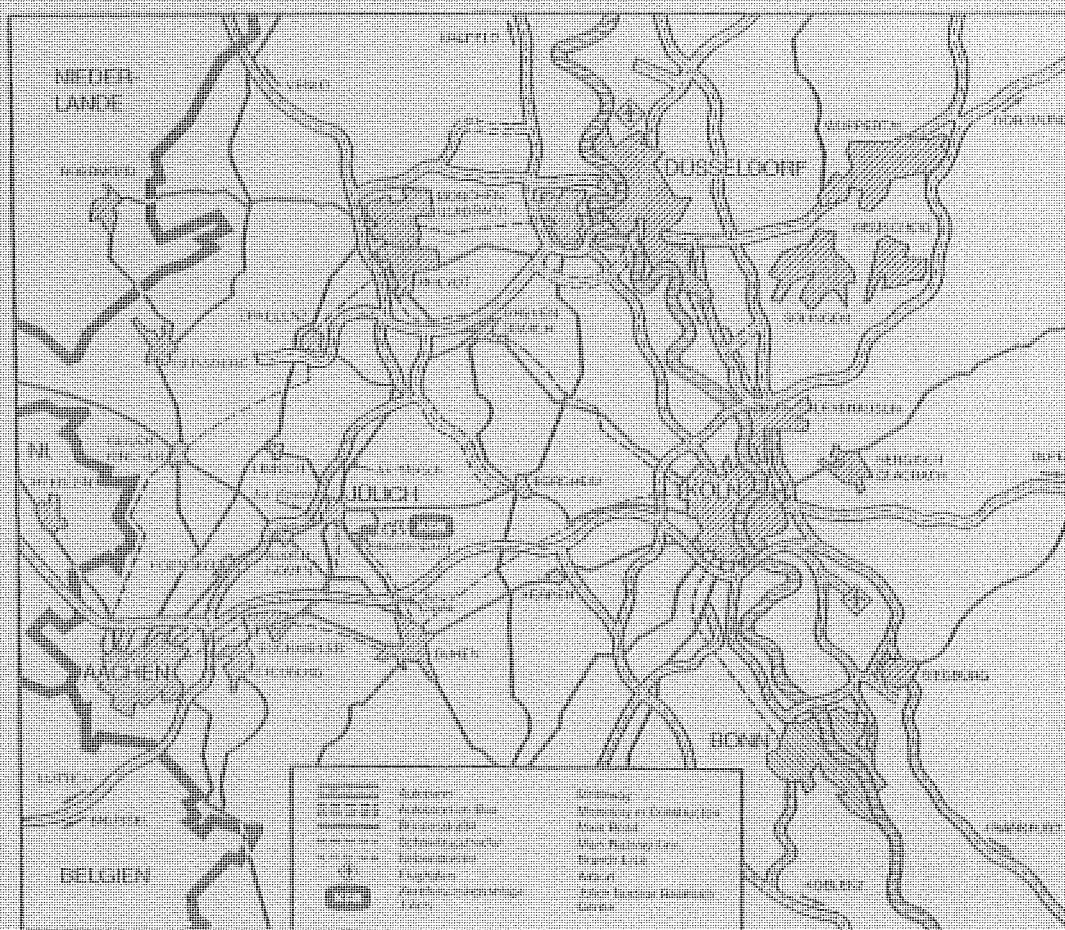
Institut für Biotechnologie

**Kontinuierliche Regenerierung von ATP
für enzymatische Synthesen**

von

W. Berke

Jül - Spez - 271
September 1984
ISSN 0343-7639



Als Manuskript gedruckt

Spezielle Berichte der Kernforschungsanlage Jülich – Nr. 271
Institut für Biotechnologie Jül-Spez-271

Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK der Kernforschungsanlage Jülich GmbH
Postfach 1913 · D-5170 Jülich (Bundesrepublik Deutschland)
Telefon: 02461/610 · Telex: 833556-0 kf d

Kontinuierliche Regenerierung von ATP für enzymatische Synthesen

von

W. Berke

D 83 (Diss. TU Berlin)

ZUSAMMENFASSUNG

Kontinuierliche Regenerierung von ATP für enzymatische Synthesen

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß das Prinzip des Enzymmembranreaktors auch bei ATP abhängigen Reaktionssystemen anwendbar ist. Durch die kovalente Bindung des Coenzym an ein lösliches Polymer wird seine Größe soweit angehoben, daß es zusammen mit den Enzymen mit einer Ultrafiltrationsmembran im Reaktor zurückgehalten werden kann. Durch die Kopplung von ATP verbrauchenden Reaktionen mit der Regenerierung durch eine enzymatische Reaktion gelingt die kontinuierliche Reaktionsführung.

Es wurden insgesamt 6 verschiedene, polymergebundene ATP-Derivate auf ihre enzymatische Aktivität hin untersucht. Es zeigte sich eine erhebliche Abhängigkeit von der Art der Verbindung (Spacer) zwischen Polymer und ATP. Ein N⁶-Derivat, über eine Aminohexylgruppe an Polyethylenglycol gekoppelt, zeigte in allen Fällen die höchste Aktivität.

Eine Reihe von überprüften Enzymen besitzt keine Aktivität. Von den zur Regenerierung von ADP geeigneten Phosphotransferasen bietet Acetat-Kinase mit polymergebundenem Coenzym die höchste Aktivität. Der dazugehörige Phosphatdonator ist Acetylphosphat. Hexokinase wurde als erstes Enzym für eine kontinuierliche Synthese ausgewählt. Sie zeigte gegenüber polymergebundenem ATP eine höhere Aktivität als mit nativem ATP.

Die kinetischen Eigenschaften von Acetat-Kinase und Hexokinase bei Verwendung von polymergebundenem Coenzym wurden experimentell ermittelt und in einem kinetischen Modell zusammengefaßt. Aus Kenntnis der Enzymkinetik konnten durch Lösen der Massenbilanzen der beteiligten Reaktanden Arbeitspunkte für die kontinuierliche Reaktionsführung der Glucose-6-phosphat-Produktion errechnet werden.

Die Glucose-6-phosphat-Produktion wurde einen Monat lang mit einem mittleren Umsatz von 80% betrieben. Die durchschnittliche Produktivität betrug 348 g/l d bei einem spezifischen Enzymverbrauch von 3.4 U/g für Hexokinase und Acetat-Kinase. Das Coenzym wurde nahezu 20000fach regeneriert.

Mit der Produktion von γ -Glutamyl-Cystein wurde eine weitere Anwendung aufgezeigt.

INHALTSVERZEICHNIS

1.0 EINFÜHRUNG	1
1.1 Enzyme für chemische Synthesen und die zentrale Bedeutung von ATP	1
1.2 Problemstellung und Zielsetzung	5
2.0 ATP-REGENERIERUNG	9
2.1 Wege der ATP-Regenerierung	10
2.2 Techniken und Verfahrensweisen zur enzymatischen Coenzymregenerierung	13
2.3 Auswahl eines Enzyms zur Regenerierung	19
3.0 DAS KONZEPT ENZYMMEMBRANREAKTOR	23
3.1 Ultrafiltration	23
3.2 Enzymkinetik	26
3.3 Allgemeines zur Reaktorauslegung	30
4.0 APPARATIVER AUFBAU	33
4.1 Substratdosierung	33
4.2 Der Reaktor	35
4.3 Kontinuierliche Analytik	39
5.0 ANALYTIK	41
5.1 Aktivitätsbestimmung ausgewählter Enzyme	41
5.2 Untersuchung der im Membranreaktor eingesetzten Enzyme	44
5.2.1 Stabilitätsuntersuchungen	45
5.2.2 Hexokinase	45
5.2.3 Acetat-Kinase	46
5.3 Konzentrationsbestimmung von ATP und ADP	46
5.4 Darstellung von Polymer-ADP	48
5.5 Messung der Enzymaktivitäten zur Kontrolle des Membranreaktors	48
5.6 Kontinuierliche Konzentrationsbestimmung des Produkts am Reaktorauslauf	49
5.6.1 Autoanalyzertechnik	49
5.6.2 Datenverarbeitung	53
6.0 POLYMERGEBUNDENES ATP	55
6.1 Allgemeine Eigenschaften und bisherige Erfahrungen	55
6.2 Charakterisierung der verwendeten ATP-Derivate	58
7.0 DAS SYSTEM ACETAT-KINASE / HEXOKINASE	67
7.1 Kinetische Untersuchung	68
7.1.1 Kinetische Messungen mit Acetat-Kinase	68
7.1.2 Kinetische Messungen mit Hexokinase	76

7.1.3	Kopplung der Enzyme	80
7.2	Stabilität der Enzyme	84
8.0	KONTINUIERLICHE PRODUKTION	89
8.1	Betrachtungen zum Reaktorbetrieb	89
8.2	Produktion von Glucose-6-phosphat	97
8.3	Produktion von -Glutamyl-Cystein	101
9.0	DISKUSSION	105
10.0	ZUSAMMENFASSUNG	113
A.0	ERGÄNZENDE ANGABEN ZU ANALYTISCHEN METHODEN	115
A.1	Testansätze zur Bestimmung von Enzymaktivitäten	115
A.2	Testansätze zu Kinetik- und Stabilitätsuntersuchungen	119
A.3	Bestimmung von ATP und ADP	121
A.4	Nachweis der Einzelaktivitäten in Reaktorproben	121
A.5	Lösungen für den Autoanalyserbetrieb	122
B.0	BERECHNUNG VON MODELLPARAMETERN	123
C.0	GERÄTE- UND CHEMIKALIENLISTE	125
C.1	Liste der verwendeten Geräte	125
C.2	Liste der verwendeten Chemikalien	126
D.0	SCHRIFTTUM	129

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

Abbildung 1.	Struktur der Adeninnukleotide	3
Abbildung 2.	Verfahren mit separater und interner ATP-Regenerierung	14
Abbildung 3.	Methoden der Immobilisierung für enzymatische Verfahren	15
Abbildung 4.	Alternative Verfahrensweisen mit Coenzymregenerierung	17
Abbildung 5.	Polarisationskonzentration mit und ohne Membranbelag	24
Abbildung 6	Parametervernetzung bei Ultrafiltration	25
Abbildung 7.	Koordination von ATP mit einem zweiwertigen Kation	27
Abbildung 8.	Produktivitätsverhältnis von Rührkessel und Rohrreaktor	31
Abbildung 9.	Verfahrensfließbild der Versuchsanlage	33
Abbildung 10.	Photographische Ansicht des Thin-channel-Reaktors	34
Abbildung 11.	Photographische Ansicht des Rührzellenreaktors	35
Abbildung 12.	Aufbau des Thin-channel-Reaktors	36
Abbildung 13.	Aufbau des Rührzellenreaktors	37
Abbildung 14.	Photographische Ansicht des Autoanalyzers	49
Abbildung 15.	Analysetechnik im kontinuierlichen Fluß	50
Abbildung 16.	Bestimmung von Glucose-6-phosphat im Autoanalyzer	51
Abbildung 17.	Extinktion des Autoanalyzers in Abhängigkeit der Glucose-6-phosphat-Konzentration	52
Abbildung 18.	Ausschnitt aus dem Extinktionsverlauf des Autoanalyzers	54
Abbildung 19.	Derivatisierung der Polymere	59
Abbildung 20.	Synthese und Struktur der untersuchten Polymer-ATP Derivate	60
Abbildung 21.	Hexokinase: Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten als Funktion der PEG(20000/40000)-ATP-Konzentration	64
Abbildung 22.	Acetat-Kinase: Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten als Funktion der PEG(20000/40000)-ATP-Konzentration	65
Abbildung 23.	pH-Abhängigkeit der Acetat-Kinase-Reaktion	68
Abbildung 24.	Temperaturabhängigkeit der Acetat-Kinase-Reaktion	69
Abbildung 25.	Acetat-Kinase: Einfluß von ADP- und Magnesiumkonzentration	70
Abbildung 26.	Acetat-Kinase: Einfluß der MgADP-Konzentration	71
Abbildung 27.	Acetat-Kinase: Einfluß der Acetylphosphat-Konzentration	72
Abbildung 28.	Acetat-Kinase: Hemmender Einfluß von Acetat	73
Abbildung 29.	Acetat-Kinase: Hemmender Einfluß von ATP	74
Abbildung 30.	Acetat-Kinase: Vergleich verschiedener PEG-ADP und nativem ADP	75

Abbildung 31.	Hexokinase: Vergleich verschiedener PEG-ATP und nativem ATP	77
Abbildung 32.	Hexokinase: Einfluß der Glucose-Konzentration . . .	78
Abbildung 33.	Hexokinase: Hemmender Einfluß von Glucose-6-Phosphat	79
Abbildung 34.	Hexokinase: Hemmender Einfluß von ADP	80
Abbildung 35.	Hexokinase: Inhibierung durch Acetylphosphat	81
Abbildung 36.	Acetat-Kinase: Einfluß von Dithiothreitol auf die Enzymstabilität	85
Abbildung 37.	Hexokinase: Einfluß von Dithiothreitol auf die Enzymstabilität	86
Abbildung 38.	Acetat-Kinase: Einfluß von Superoxid-Dismutase auf die Enzymstabilität	87
Abbildung 39.	Stabilität von ATP-Derivaten	88
Abbildung 40.	Anfahrvorgang bei der kontinuierlichen Produktion im Enzymmembranreaktor	90
Abbildung 41.	Stationäre Zustände im Fließgleichgewicht von Hexokinase und Acetat-Kinase	91
Abbildung 42.	Umsatz und Produktivität als Funktion der Verweilzeit	92
Abbildung 43.	Umsatz und Produktivität als Funktion der Substratkonzentration	93
Abbildung 44.	Umsatz als Funktion der Adenosinphosphatkonzentration	94
Abbildung 45.	Umsatz als Funktion des Verhältnisses der Enzymaktivitäten	95
Abbildung 46.	Umsatz als Funktion des Verhältnisses der Enzymaktivitäten bei erhöhter Glucosekonzentration	96
Abbildung 47.	Kontinuierliche Produktion von Glucose-6-phosphat im Thin-channel-System	99
Abbildung 48.	Kontinuierliche Produktion von Glucose-6-phosphat in der Rührzelle	100
Abbildung 49.	Kontinuierliche Produktion von γ -Glutamyl-Cystein	103
Abbildung 50.	Mechanismus von Creatin-Kinase	105

VERZEICHNIS DER TABELLEN

Tabelle 1.	Vergleich der Regenerierungswege	13
Tabelle 2.	Vergleich der Verfahrensalternativen	18
Tabelle 3.	Mögliche Kinasen zur ATP-Regenerierung und ihre ihre Phosphatdonatoren	20
Tabelle 4.	Daten zu den verwendeten Enzymmembranreaktoren . .	38
Tabelle 5.	Aktivitätstests mit Polymer-ATP/ADP	42
Tabelle 6.	Vergleich von polymergebundenen ATP-Derivaten . .	57
Tabelle 7.	ATP-Gehalt der untersuchten Derivate	63
Tabelle 8.	Relative Enzymaktivität mit Polymer-ATP	66
Tabelle 9.	Formale Parameter zu den Kurven in Abbildung 28 .	75
Tabelle 10.	Formale Parameter zu den Kurven in Abbildung 29 .	76
Tabelle 11.	Acetat-Kinase: Verwendete Parameter zur kine- tischen Modellierung	82
Tabelle 12.	Hexokinase: Verwendete Parameter zur kinetischen Modellierung	83
Tabelle 13.	Leistungsmerkmale zur kontinuierlichen Glucose-6- phosphat-Produktion	101
Tabelle 14.	Betriebsbedingungen zur kontinuierlichen γ -Glutamyl- Cystein-Synthese	104

SYMBOLVERZEICHNIS

Formelsymbole

c	mol/l	Konzentration
c_F	mol/l	Stoffkonzentration im Filtrat
c_R	mol/l	Stoffkonzentration im Retentat
c_0	mol/l	Stoffkonzentration im Reaktorzulauf
D	1/s	Verdünnungsrate
F	m ³ /m ² s	Membranfluß
$h\nu$	J	Lichtquant
k	1/s	Geschwindigkeitskonstante
k_f	1/s	Geschwindigkeitskonstante Produktbildung
k_b	1/s	Geschwindigkeitskonstante Rückreaktion
k_h	1/s	Geschwindigkeitskonstante Hydrolyse
K_{eq}	mol/l	Gleichgewichtskonstante
K_m	mol/l	Michaelis-Menten-Konstante
K_{mA}	mol/l	Michaelis-Menten-Konstante für A
K_{mB}	mol/l	Michaelis-Menten-Konstante für B
K_{mP}	mol/l	Michaelis-Menten-Konstante für P
K_{mQ}	mol/l	Michaelis-Menten-Konstante für Q
K_i	mol/l	Inhibierungskonstante
K_{ja}	mol/l	Inhibierungskonstante für A
K_{jp}	mol/l	Inhibierungskonstante für P
K_{jq}	mol/l	Inhibierungskonstante für Q
K_{ji}	mol/l	Inhibierungskonstante für I
K_{jil}	mol/l	Inhibierungskonstante für I
K_{ia}	mol/l	Dissoziationskonstante für A
K_{ib}	mol/l	Dissoziationskonstante für B
K_{ip}	mol/l	Dissoziationskonstante für P
K_{iq}	mol/l	Dissoziationskonstante für Q
Δp	Pa	Druckdifferenz über die Membran
P	mol/l s	Produktivität
R	-	Retention
t	s	Zeit
V	kat/l	Reaktionsgeschwindigkeit
V_{max}	kat/l	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
V_{max}^f	kat/l	maximale Reaktionsgeschwindigkeit der Hinreaktion
V_{max}^b	kat/l	maximale Reaktionsgeschwindigkeit der Rückreaktion
V^{HK}	kat/l	Nettoreaktionsgeschwindigkeit von Hexokinase
V^{AK}	kat/l	Nettoreaktionsgeschwindigkeit von Acetat-Kinase
W	Pa s/m	Hydraulischer Widerstand

verwendete Abkürzungen

A	erstes Substrat einer Enzymreaktion
Ac	Acetat
AcP	Acetylphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Acetat-Kinase
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adosintriphosphat
B	zweites Substrat einer Enzymreaktion
CSTR	idealer Rührkessel (Continuous stirred tank reactor)
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	Enzym
FAD(H)	Flavin-adenin-dinucleotid
Glc	Glucose
G6P	Glucose-6-phosphat
HK	Hexokinase
I	Inhibitor
NAD(H)	Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid
PEG	Polyäthylenglycol
PEI	Polyäthylenimin
P	erstes Produkt einer Enzymreaktion
P	anorg. Phosphatrest
PP	anorg. Pyrophosphatrest
PFTR	idealer Strömungsrohrreaktor (Plug flow tubular reactor)
Q	zweites Produkt einer Enzymreaktion
X	Reaktand

1.0 EINFÜHRUNG

1.1 ENZYME FÜR CHEMISCHE SYNTHESSEN UND DIE ZENTRALE BEDEUTUNG VON ATP

Die chemische Industrie zeigt, nicht zuletzt durch das gestiegene Umweltbewußtsein, verbunden mit einer kritischen Betrachtung vorhandener Produktionstechniken, wachsendes Interesse an alternativen Verfahren. Darunter sind biologische Verfahren auch in der Öffentlichkeit mit einem positiven Prestige belegt. Sie gelten in besonderem Maße als sauber und umweltverträglich.

In lebenden Zellen wird nahezu jede der tausenden möglichen chemischen Reaktionen des Stoffwechsels mit Proteinen höchster Aktivität, den Enzymen, katalysiert. Sie sind die effektivsten Katalysatoren, die wir kennen. Prinzipiell kann mit ihnen eine Fülle organischer Substanzen erzeugt werden, darunter auch solche, die nicht in vivo vorkommen. Bisher bediente man sich der Enzyme vorwiegend mittels fermentativer Techniken, die die Fähigkeit ausgesuchter Mikroorganismen zur Biosynthese nutzen. Da im komplexen System des Stoffwechsels Nebenprodukte entstehen und der Umgang mit Organismen oft besondere Maßnahmen im Betrieb erfordert, wird die gesteigerte Aufmerksamkeit für isolierte Enzymreaktionen verständlich. Ihr Einsatz erlaubt zusätzlich die Kombination von Enzymen verschiedenster Herkunft.

Die Verwendung von Enzymen in der Industrie begann vor 90 Jahren, als der Japaner Takamine ein Amylasepräparat aus *Aspergillus oryzae*, die sogenannte Taka-Diastase, in das Gärungsgewerbe einführte. Bis zur Jahrhundertwende hatten Enzympräparate aus Malz und Pankreas zur Entschlichtung von Fasern Eingang in die Textilindustrie gefunden. Kurze Zeit später entwickelte Otto Röhm proteolytisch wirksame Pankreaspräparate zum Beizen von Häuten in der Gerberei und als Waschmittelzusatz. Diesen ersten Anfängen folgten weitere Anwendungen technischer Enzyme zur Verarbeitung von Naturprodukten, vorrangig Lebensmitteln. Nachdem in den vierziger Jahren mit der Entwicklung der Submerskultur die großtechnische Gewinnung mikrobieller Enzyme möglich wurde, gelang der eigentliche Durchbruch erst um 1965 durch die zunehmende Verwendung in der Waschmittel- und Stärkeindustrie.

Trotz dieser Erfolge und weiterer, erheblicher Fortschritte auf dem Gebiet der Biotechnologie zur Gewinnung, Reinigung und Stabilisierung der Enzyme wuchs die Anzahl der im großen Maßstab durchgeführten technischen Anwendungen nur wenig. Die Mehrzahl von Anwendungen in der Chemie oder Lebensmitteltechnologie beschränkt sich auf Hydrolyse oder die Isomerisierung von Naturstoffen. Als Beispiele seien Amylasen, Prote-

asen und Glucoseisomerase sowie die in kleinerem Umfang eingesetzte Aminoacylase und β -Lactamase erwähnt.

Für synthetische Prozesse, d.h. für den Aufbau von Produkten aus einfacherem Ausgangsmaterial, werden nur selten Enzyme verwendet. Konventionelle organische Synthesen bieten dazu meistens flexiblere und effizientere Wege, auch komplexe Substanzen aufzubauen. Sie stoßen aber bei verschiedenen Problemen der selektiven Manipulation von funktionellen Gruppen und bei stereospezifischen Synthesen auf Schwierigkeiten. Enzymatische Verfahren laufen bei milden Bedingungen mit teilweise extremer Spezifität und Selektivität in wäßrigen Lösungen ab. Höhere Ausbeuten, höhere Reinheit und leichte Produktisolierung sind weitere Vorteile, die die Konkurrenzfähigkeit gegenüber chemischen Verfahren verbessern. Trotzdem haben nur wenige enzymatische Synthesen den Produktionsmaßstab erreicht, z.B. die stereospezifische Synthese von L-Malat aus Fumarat mit Hilfe von Fumarase.

Welcher Faktor, abgesehen von der Konkurrenz der chemischen Verfahren, behindert nun die verstärkte Enzymnutzung für organische Synthesen? Zum einen mögen Einschränkungen, die sich aus der Natur der Enzyme ergeben, verantwortlich sein, beispielsweise nicht beliebig wählbare Prozeßparameter wie Temperatur, Substratkonzentration, pH oder Ionenstärke. Weiterhin erscheint die Gewinnung der passenden Enzyme, die intrazellulär in oft nur geringer Konzentration zur Verfügung stehen, zunächst als zu aufwendig und ihre Stabilität als mangelhaft.

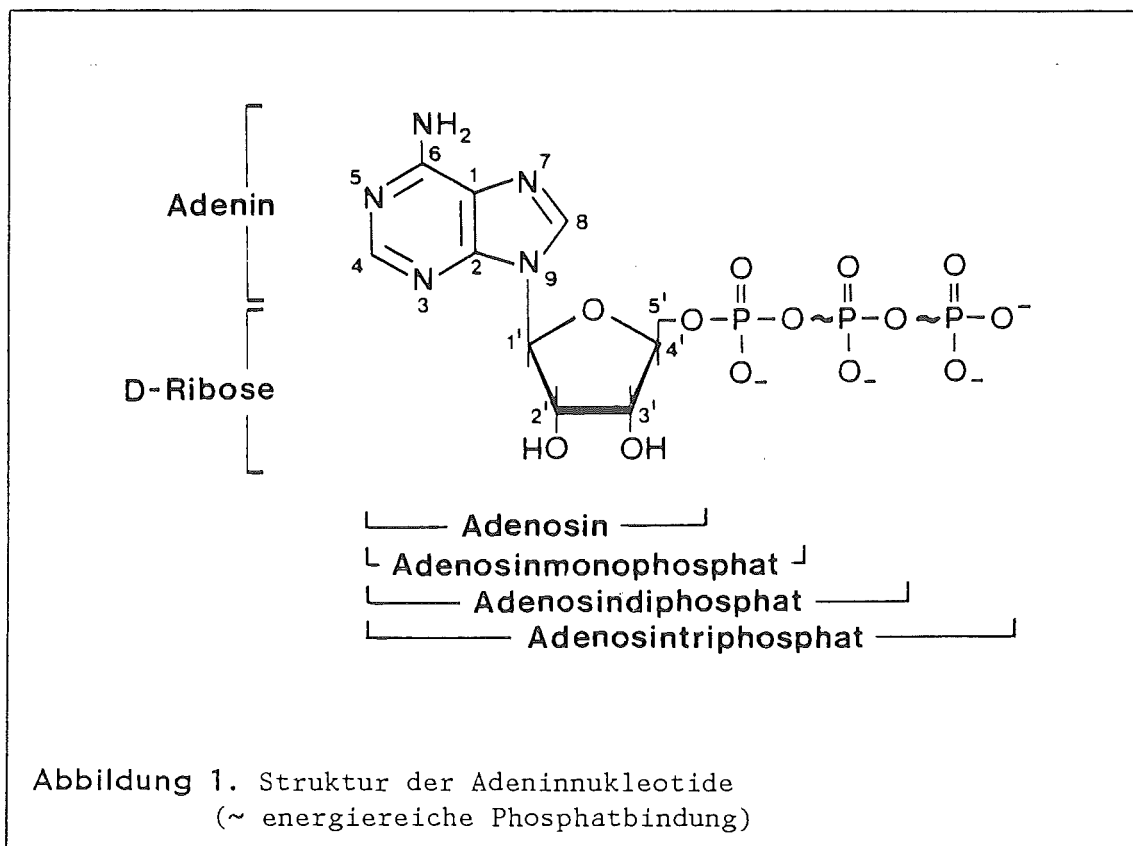
Das entscheidende Hindernis für den Enzymeinsatz bei Synthesen hat seine Ursache im Organisationsprinzip von anabolen und katabolen Vorgängen zellulärer Prozesse. Die Übertragung der chemischen Energie, die bei Atmung, Photosynthese oder Abbaureaktionen freigesetzt wird, auf die verschiedenen endergonischen Reaktionen wird durch die Vermittlung eines gemeinsamen Zwischenprodukts, des Adenosintriphosphat (ATP), realisiert.

Die Verwendung von universalen, intermediären Überträgern, sogenannten Coenzymen bzw. Cosubstraten, ist ein grundlegendes Prinzip, mit dem neben chemischer Energie vor allem funktionelle Gruppen, spezielle Atome oder Elektronen übertragen werden. Die Schätzung, daß circa 40% der bekannten Enzyme von solchen Coenzymen abhängig sind /1/, macht ihre Bedeutung im Stoffwechsel deutlich. Neben ATP, welches außer der Vermittlung chemischer Energie auch zum Übertragen von Phosphat dient, zählt Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid (NAD) als Überträger von Wasserstoff bei Reduktions- oder Oxidationsvorgängen zu den wichtigsten Coenzymen.

Enzyme mit Reaktionen des gleichen Typs verwenden in der Regel auch das gleiche Coenzym, sie schöpfen dabei aus einem gemeinsamen Pool des jeweiligen Zellkompartiments. Der Cofaktor kann sowohl fest am Enzym

gebunden sein (prosthetische Gruppe) oder wie im Falle des ATP als eines der spezifischen Substrate fungieren (Cosubstrat). Soll nun eine solche cosubstratabhängige Reaktion *in vitro* ausgeführt werden, muß der stöchiometrische Verbrauch dieser Komponente berücksichtigt werden. Die entstehenden hohen Kosten schließen in diesem Fall die Entwicklung ökonomisch durchführbarer enzymatischer Syntheseprozesse aus, solange der Cofaktor nach Verbrauch verloren geht.

Mit ATP verfügt die lebende Zelle über ein Molekül mit einer leicht zu bildenden und hydrolytisch wieder lösbaren Bindung mit hohem Energiegehalt (Abbildung 1). Eine in Richtung Biosynthese ablaufende Enzymreaktion ist obligatorisch an die energieliefernde Spaltung von ATP gekoppelt, so daß die Gesamtreaktion exergon wird. Organismen führen die Regenerierung von verbrauchtem ATP in einer perfekten und effizienten Weise vor. Durch allosterische Enzyme, deren Modulatoren Adenosintri-, -di- und -monophosphat (ATP, ADP, AMP) sind, wird die Rate der ATP-Erzeugung der des ATP-Verbrauchs in einem dynamischen Fließgleichgewicht angepaßt. Angesichts der geringen zellulären Konzentration von Adenylaten zwischen 1 und 5 mmol/l wird klar, daß ATP keine Speicherfunktion haben kann und die terminale Phosphatgruppe einem sehr schnellen Turnover unterliegt. In der Tat lassen sich in Zellen von *E. coli* Halbwertszeiten des ATP-Umsatzes von wenigen Sekunden bestimmen.



Der Mechanismus, mit dem eine enzymatische Synthese mit dem Abbau von ATP gekoppelt wird, beinhaltet immer Reaktionsschritte, bei denen ein Teil des Coenzym auf ein Akzeptormolekül übertragen wird. Durch diesen Vorgang wird das Produkt in den gewünschten energiereichen Zustand versetzt, der für die Folgereaktion oder den anschließenden Biosyntheseweg notwendig ist. Es bestehen folgende Reaktionsmöglichkeiten:

1. Die terminale Endgruppe des ATP wird auf ein Substrat X übertragen, dabei entsteht Adenosindiphosphat und das phosphorylierte Substrat.



Die diese Reaktion katalysierenden Enzyme zählen zu der Gruppe der Phosphotransferasen (EC 2.7.1-5)

2. Es wird Pyrophosphat mit dem Substrat verknüpft und dabei Adenosinmonophosphat gebildet.



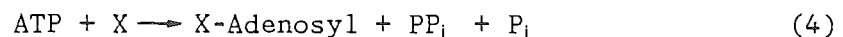
Die dazugehörigen Enzyme sind unter der EC-Nummer 2.7.6 als Diphosphotransferasen klassifiziert.

3. Der terminale Pyrophosphatrest wird abgespalten und das entstehende AMP auf das Substrat übertragen.



Die entsprechenden Enzyme werden den Nucleotidyltransferasen zugeordnet (EC 2.7.7)

4. Alle drei Phosphatreste werden vollständig als Pyrophosphat und Phosphat abgespalten, der verbliebende Adenosylrest reagiert mit dem Substrat.



Dieser in der Zelle nur in wenigen Fällen beschrittenene Weg der ATP-Nutzung wird von von unter EC 2.5.1 eingeordneten, sogenannten Adenosyltransferasen katalysiert.

5. Das Enzym reagiert mit zwei Molekülen, zu deren Verknüpfung eine Aktivierung erforderlich ist; das ATP tritt dabei in einem intermediären Komplex auf. Letztlich wird es in ADP und Phosphat oder AMP und Pyrophosphat gespalten.



Enzyme, die nach diesem Schema neue Bindungen aufbauen, sind als Ligasen in Gruppe 6 der Enzymklassen zusammengefaßt.

Viele dieser Enzyme werden mit Trivialnamen belegt. Als Kinasen werden in der Regel Enzyme der ersten beiden Reaktionstypen bezeichnet (EC 2.7.1-6). Die Bezeichnung Synthetase wird oft synonym für Ligase gebraucht.

Mit der obigen Aufzählung der Enzymtypen sind auch die Möglichkeiten für den technischen Gebrauch umrissen. Die meisten biochemischen Reaktionen, die von ATP als Cofaktor abhängig sind, führen zu ADP und AMP. Somit sind es Kinasen und Ligasen, die auf besonderes Interesse stoßen. Der vierte Reaktionsweg zu Adenosylverbindungen findet für wenige spezielle Verbindungen Verwendung. Die Biosynthesen von S-Adenosylmethionin oder Adenosylcobalamin sind bekannte Beispiele. Eine mögliche Akzeptanz von nichtphysiologischen Verbindungen bei ATP abhängigen Enzymen, wie sie in einigen anderen Enzymen gefunden wird /2/, ist noch nicht gezielt überprüft worden.

Da sich mit Enzymen ihrem Ursprung gemäß natürlich vorkommende Substanzen synthetisieren lassen, ist das besondere Interesse der Pharma- und Lebensmittelindustrie verständlich. Die bisherigen Anstrengungen konzentrieren sich bislang auf die nichtribosomale Synthese von Peptiden wie Glutathion /3/, Bacitracin A /4/ und Gramicidin S /5,6,7/ oder auf einfache Phosphorylierungen von Monosacchariden /8,9/ oder Nukleotiden /10/.

1.2 PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Um thermodynamisch bevorzugt abzulaufen, benötigen die meisten biosynthetischen Aufbaureaktionen eine Energiezufuhr. Wie einleitend erläutert, ist in der Mehrzahl der Fälle diese Bereitstellung von Energie an die Verwendung des Nukleotids ATP gebunden. Soll nun eine kontinuierliche Produktion einer (bio)chemischen Substanz mit Enzymen durchgeführt werden, wird eine laufende Ergänzung des verbrauchten Coenzym notwendig.

Das zentrale Problem beim Einsatz Cofaktor-abhängiger Enzyme ist durch seinen hohen Preis gegeben. ATP ist dabei, verglichen mit anderen Coenzymen, noch nicht allzu teuer, bei Abnahme von Kilogrammengen kostet ATP ca. 600 DM/mol. Doch es gibt wohl nur wenige organische Reaktionen, die

Kosten dieser Größenordnung bei stöchiometrischen Reagentien tolerieren können. Der wirksamste Weg zur Reduktion der effektiven Cofaktorkosten ist die Entwicklung eines Prozesses mit Recycling. Der Cofaktor muß aus der Produktlösung abgetrennt und regeneriert werden und steht danach wieder der Reaktion zur Verfügung. Die erforderliche Mindestzahl von Regenerierungen hängt unter anderem von dem Verhältnis der Substrat- und Coenzymkosten zum Wert des erzeugten Produkts ab. Wird beispielsweise die eben noch wirtschaftlich vertretbare Preisgrenze für ATP auf 0.60 DM/mol festgesetzt, kann aus dem oben angegebenen Einkaufspreis leicht errechnet werden, daß das ATP mindestens 1000fach wiederverwendet werden muß. Solche hohen Zyklenzahlen lassen sich nur erreichen, wenn der Prozeß der Regenerierung mit hoher Ausbeute arbeitet. Bei einem Verlust von 0.1% je Regenerierung ist nach 1000 Zyklen nur noch ein Drittel der anfangs eingesetzten Coenzymmenge vorhanden.

In den letzten fünfzehn Jahren sind bereits eine Reihe der verschiedensten Ansätze zur Regenerierung verbrauchter Coenzyme entwickelt und auf ihre Brauchbarkeit überprüft worden, ohne daß sich ein Verfahren als besonders vorteilhaft herausstellte. Dessen ungeachtet erlauben einige von ihnen enzymatische Synthesen auf ökonomische Weise durchzuführen.

Für die Durchführung NAD(H) abhängiger Reaktionen hat sich das Konzept des Enzymmembranreaktors bereits als geeignet erwiesen /11/. In ihm werden sowohl Enzym als auch Coenzym durch eine Ultrafiltrationsmembran zurückgehalten. Zur Rückhaltung des Coenzym wird das Molekulargewicht, d.h. die Größe des Coenzym, durch kovalente Bindung an ein gelöstes Polymer angehoben.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Technik des Enzymmembranreaktors mit polymergebundenem Coenzym auf ATP verbrauchende Reaktionssysteme zu übertragen und auf seine Eignung zu überprüfen. Dabei werden die folgenden Schwerpunkte gesetzt:

- Entwicklung geeigneter Analyseverfahren zur Bestimmung der beteiligten Stoffe sowie zur kontinuierlichen Prozeßkontrolle
- Charakterisierung der polymergebundenen ATP-Derivate
- Bestimmung von prozeßrelevanten Parametern der eingesetzten Enzyme
- Versuche zur Erhöhung der Enzymstabilität unter Reaktorbedingungen
- Aufbau und kontinuierlicher Betrieb einer geeigneten Membranreaktoranlage. Hexokinase soll als vergleichsweise einfaches Beispiel für eine ATP verbrauchende Reaktion dienen.
- Überprüfung der Übertragbarkeit des Verfahrens auf andere Enzymsysteme und kontinuierliche Produktion weiterer Substanzen.

Zunächst werden die alternativen Verfahrensweisen auf ihre Brauchbarkeit hin untersucht und die zum Reaktorbetrieb nötigen theoretischen Grundlagen dargelegt.

2.0 ATP-REGENERIERUNG

Im folgenden Kapitel sollen die zur Phosphorylierung von verbrauchtem Coenzym zur Verfügung stehenden Verfahren dargelegt und bewertet werden. Dazu lassen sich für einen idealen, universell einsetzbaren Prozeß eine Reihe von maximalen Anforderungen angeben. Die einzelnen Verfahrensalternativen können dann am Anforderungsprofil gemessen und verglichen werden. Unter Berücksichtigung von Gewichtungen der Teilziele erkennt man dann die jeweils optimalen Lösungen. Die Gewichte sind dabei nicht nur von der speziellen Synthesaufgabe abhängig, sondern werden in erheblichen Umfang von der Ausstattung an Mitteln und vorhandenen Menge an Know-how bestimmt.

Der für die Regenerierung des ATP ausgewählte Prozeß sollte folgenden Anforderungen genügen:

ADP und AMP: Es sollte möglichst jede ATP verbrauchende Reaktion verwendet werden können. Die Regenerierung sollte sowohl ADP als auch AMP erfassen.

Anpassungsfähigkeit: Die Randbedingungen, unter denen die Regenerierung durchführbar ist, sollen die enzymatische Synthesereaktion nicht beeinträchtigen. Ein universell einsetzbares Verfahren muß einen breiten Raum zur Einstellung von Parametern zulassen, ohne daß ein merklicher Leistungsverlust eintritt.

Umsatz: Zum Erreichen hoher Umsätze muß die Bildung von ATP thermodynamisch bevorzugt sein.

Coenzymnutzung: Das Verfahren muß eine größtmögliche Anzahl von Regenerierschritten (Zyklenzahlen) bieten. Es darf möglichst wenig ATP zerstört werden oder verloren gehen.

Katalysator: Verwendete Katalysatoren sollten verfügbar sein und effektiv genutzt werden.

Substrate: Phosphatdonator und weitere eingesetzten Substrate oder Hilfsstoffe sollen preiswerte, handelsübliche Substanzen sein. Ihre Eigenschaften sollten keine weiteren nachteiligen Auswirkungen mitsichbringen (z.B. Giftigkeit, Instabilität, niedrige Löslichkeit).

Stabilität: Das Verfahren sollte sich über längere Zeit in einem stabilen Zustand befinden und die Produktzusammensetzung ein-

heitlich bleiben. Eine anschließende Aufarbeitung darf nicht erschwert werden.

Automatisierbarkeit: Um eine automatische Betriebsweise zu ermöglichen, sollte die Durchführung der Regenerierung unkompliziert und leicht zu kontrollieren sein.

Kontinuierlicher Betrieb: Wegen der gegenüber absatzweiser Prozeßführung höheren Produktivität ist zur ATP-Regenerierung ein kontinuierliches Verfahren zu bevorzugen.

Zunächst werden die alternativen Prinzipien der ATP-Regenerierung auf ihre Brauchbarkeit geprüft. Mit der ausgewählten Methode läßt sich dann ein optimales Verfahren erstellen.

2.1 WEGE DER ATP-REGENERIERUNG

Zur Phosphorylierung von Adeninnucleotiden stehen vier Möglichkeiten zur Verfügung:

1. Die chemische Phosphorylierung,
2. die Verwendung ganzer Zellen oder
3. Organellen, sowie
4. von zellfreien Enzymen.

Das regenerierte ATP wird in einer Enzymreaktion in wäßriger Lösung verbraucht. Da die meisten organischen Lösungsmittel für die Enzymaktivität schädlich sind, ist es vernünftig, auch das regenerierende System in wäßriger Umgebung arbeiten zu lassen. Um eine saubere ATP-Versorgung sicherzustellen, wird andernfalls eine Reihe von aufwendigen Trenn- und Wiedergewinnungsoperationen notwendig.

Für die chemische ATP-Synthese aus Adenosin, AMP und ADP sind eine Anzahl von Phosphorylierungen entwickelt worden. Bis auf eines arbeiten alle Verfahren in nichtwäßrigen Lösungsmitteln /12/. Auch bei hohem Überschuß von Reagenzien werden nur ungenügende Ausbeuten von unter 90% erzielt /13/. All diesen Methoden ist der hohe Anteil unerwünschter Nebenprodukte, beispielsweise höhere Phosphate, gemeinsam, so daß die Ausbeuten der meisten Phosphorylierungen unter 60% bleiben. Die damit verbundene zu kleine Zahl von Wiederverwendungen, der nötige Aufwand bis wieder ATP für die gewünschte Enzymreaktion zur Verfügung steht und

der Preis der Reagenzien machen die chemischen Verfahren für die Regenerierung ungeeignet.

Bei Reaktionen, in denen das ATP ohne unmittelbare Coenzymfunktion verbraucht wird und im Produkt auftritt, beispielsweise beim Aufbau von Nucleinsäuren, bei Adenylat-Cyclaseaktivität oder Transferasereaktionen zur Synthese von Coenzym A oder Flavin-adenin-mononucleotid, gibt es keine Akkumulation der Verluste. In diesen Fällen der Substratdarstellung haben chemische Phosphorylierungen weiterhin ihren Wert und müssen als Alternative in Betracht gezogen werden.

Bisher ohne Bedeutung sind Vorschläge, ATP auf elektrochemischem Wege darzustellen /14,15/.

Zellen werden bereits seit längerer Zeit mit Erfolg zur Regenerierung des ATP eingesetzt. Als Organismen werden häufig Hefen verwendet /9,16-23/. Rohstoffe sind lediglich Glucose oder Fructose sowie anorganisches Phosphat. Es wird bei diesen Verfahren keine Fermentation mit lebenden Zellen durchgeführt, sondern die Zellwand wird durch Trocknung mit Aceton, Lyophilisierung oder Detergenzien zerstört und für die Substrate und Produkte durchlässig gemacht. Das gleiche Ergebnis läßt sich durch mechanisches Aufbrechen oder osmotische Lysis erreichen. Wie die auftretenden Zwischenprodukte zeigen, ist die Glycolyse der für die Phosphorylierung verantwortliche Stoffwechselweg. Daneben gibt es in den Präparationen eine Vielzahl weiterer intakter Enzyme, darunter auch solche, die ATP abbauen und unspezifisch als ATPase-Aktivität zusammengefaßt werden. Substrate werden zusätzlich in Nebenreaktionen verbraucht. Der erreichbare Umsatz ist dadurch erheblich eingeschränkt und übersteigt kaum 80% /24/. Außer der Glycolyse lassen sich auch einzelne Enzyme in der Zelle zur Phosphorylierung einsetzen, wenn man das entsprechende Substrat anbietet. Damit sind allerdings höhere Substratkosten verbunden. Als ein Beispiel sei die Regenerierung mit Acetat-Kinase in *E. coli* angeführt /25/. Ein neuer Weg wird bei Versuchen mit photosynthetisierenden Mikroorganismen beschritten /26/.

Auch wenn sich die Anteile von Nebenreaktionen und die Ausbeute nicht wesentlich verbessern lassen, bietet die Verwendung von Zellen die Möglichkeit, ein über längere Zeit stabiles Verfahren aufzubauen. Der Einsatz von Zellen läßt die direkte Kopplung von ATP verbrauchender und ATP regenerierender Reaktion zu. Das Produkt kann sowohl durch den gleichen oder einen zweiten Organismus als auch durch isolierte Enzyme im gleichen Reaktor erzeugt werden, beispielsweise die gemeinsame Immobilisierung von *Brevibacterium ammoniagenes* zur Produktion von NADP aus NAD und *S. cerevisiae* zur ATP-Regenerierung /17/. Ihre Wirtschaftlichkeit stützt sich vor allem auf die Verwendung eines einfachen Katalysators und billiger Glucose als Substrat.

Anstelle ganzer Zellen lassen sich auch ATP produzierende Organellen nutzen. Bei aeroben Organismen sind dies die Mitochondrien, bei photoautotrophen Organismen die Chloroplasten bzw. Chromatophore. Bei Mitochondrien ist die Phosphorylierung von ADP an den Elektronentransport der Atmungskette geknüpft. Für die technische Nutzung stellt sich dabei die Frage nach einem geeigneten Substrat, da teures NADH oder FADH allein nicht in Frage kommen und regeneriert werden müßte. Hier bietet sich Pyruvat an, das durch die ebenfalls in den Mitochondrien lokalisierten Enzyme des Tricarbonsäurezyklus abgebaut wird. Bevor Mitochondrien zur Regenerierung von ATP interessant werden, ist allerdings die erreichbare Lebensdauer um mindestens eine Zehnerpotenz zu erhöhen. Bislang können unter Reaktionsbedingungen Halbwertszeiten von wenigen Stunden erzielt werden /27/.

Photosynthetische Organellen erscheinen als attraktive Alternative. Sie benötigen nur Lichtenergie und verbrauchen keinen Sauerstoff oder andere Substrate. Jedoch reagieren Chloroplasten ebenfalls empfindlich auf mechanischen oder chemischen Stress. Aus Procarionten isolierte photosynthetisierende Membranen haben sich dagegen zumindest in immobilisierter Form als prinzipiell geeignet erwiesen /28-33/. Stabilität und Umsatz erreichen die Größenordnung von Verfahren mit ganzen Zellen.

Maximale Umsätze mit Reaktanden in nahezu stöchiometrischen Verhältnissen als eine der Voraussetzungen zu einer wirtschaftlichen Regenerierung des Coenzyms lassen sich bislang nur mit zellfreien Enzymen erreichen. Wegen der Spezifität der Enzyme kommt es nicht mehr zu unerwünschten Nebenprodukten. Dem Nachteil des Aufwands von Zellaufschluß und Isolierung steht die höhere, erreichbare Volumenaktivität gegenüber. Die Notwendigkeit eines gesonderten Regenerierreaktors entfällt, da sich enzymatische Regenerierung von ATP ohne große Schwierigkeit mit der ATP verbrauchenden Reaktion koppeln lassen. Verbrauch und Regenerierung bilden - dies ist für eine reaktionstechnische Betrachtung wichtig - ein gut definierbares System. Bei im Einzelfall zu hoher Empfindlichkeit eines freien Enzyms gegenüber äußeren Einflüssen stehen eine Reihe geeigneter Maßnahmen zur Stabilisierung zur Verfügung /34/.

Mit weit über 100 Enzymen, die ATP umsetzen (vgl. Kapitel 2.3), steht prinzipiell eine Vielzahl von Wegen offen.

Die mit den beschriebenen Methoden erreichbaren Teilziele sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt. Die angegebenen Wertungen beziehen sich dabei auf maximal erreichbare Werte, die in der Regel mit einem bestimmten Verfahren erzielt wurden. So gehören die höchsten Angaben zur Stabilität oft zu Verfahren mit immobilisiertem Katalysator. Wählt man ein anderes Verfahren, sind gegebenenfalls entsprechende Korrekturen vorzunehmen.

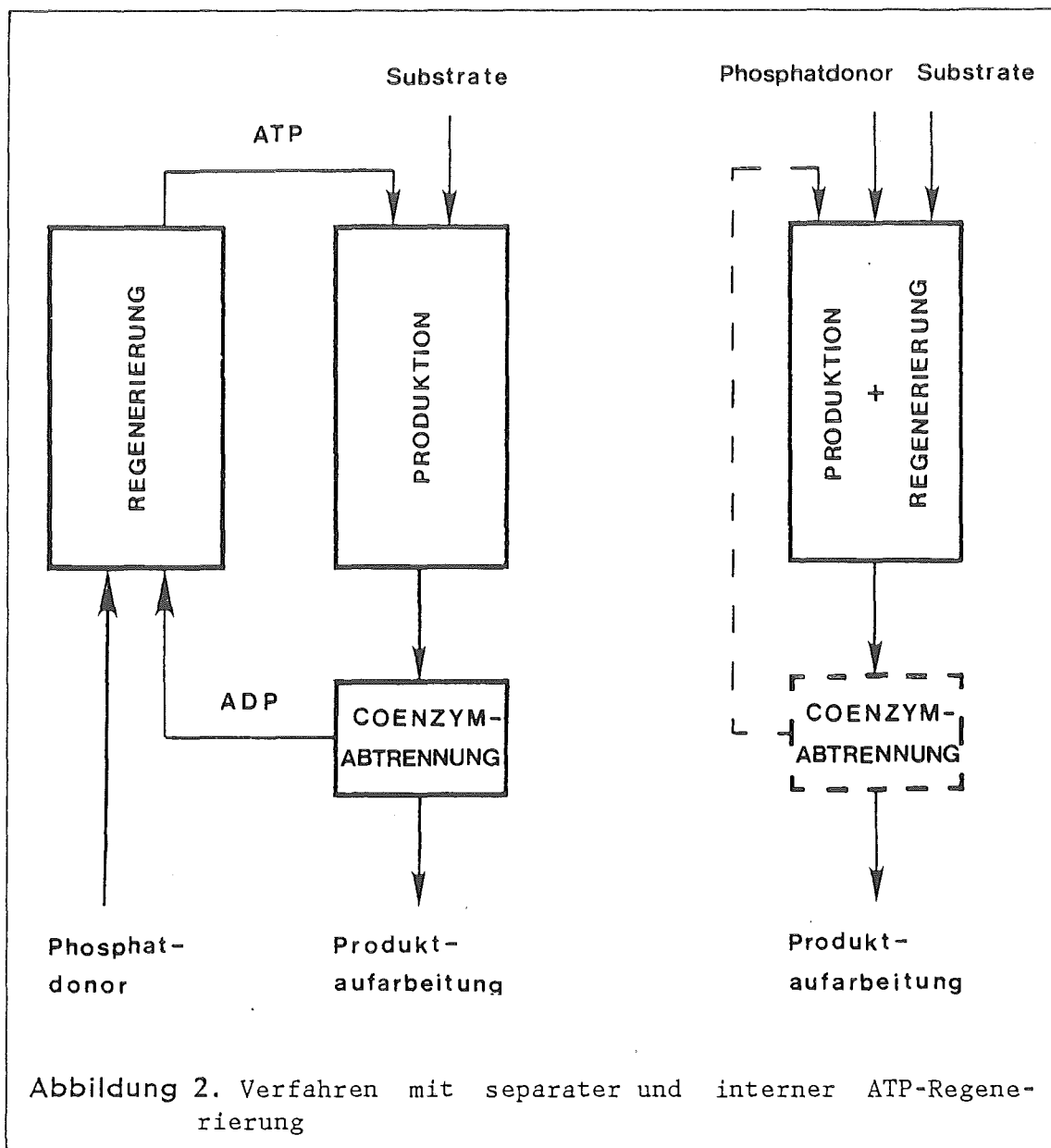
	chemisch	Zellen	Organellen	Enzyme
ADP und AMP	+	+	0	+
Anpassungsfähigkeit	-	++	+	++
Umsatz	-	0	0	++
Coenzymnutzung	-	0	0	++
Katalysator		++	+	++
Substrate	0	++	++	+
Stabilität	+	++	+	++
Automatisierbarkeit	-	++	+	++
Kontinuierl. Betrieb	0	++	++	++

Tabelle 1. Vergleich der Regenerierungswege
(Merkmal (++)leicht (+)gut (0)schwer (-)nicht erfüllbar)

Als Ergebnis der Betrachtung läßt sich festhalten, daß die Verwendung von Zellen und Enzymen zu den zur Zeit aussichtsreichsten Verfahren führt. Techniken mit Organellen bzw. biologischen Membranen haben noch nicht den gleichen Entwicklungsstand erreicht. Die Anforderungen an Umsatz und eine effektive Coenzymnutzung führten in dieser Arbeit letztlich zur Wahl eines enzymatischen Verfahrens.

2.2 TECHNIKEN UND VERFAHRENSWEISEN ZUR ENZYMATISCHEN COENZYMREGENERIERUNG

Wie aus Abbildung 2 ersichtlich ist, können Verfahren, in denen die Enzyme zur Regenerierung und zur Produktion gemeinsam in einem Apparat eingesetzt werden, mit weniger Aufwand betrieben werden. Dies gilt in jedem Fall, in dem auf eine Coenzymabtrennung verzichtet wird oder keine Abtrennung notwendig ist. In der Abbildung ist diese Möglichkeit durch die Strichelung angedeutet. Der überwiegende Teil der im folgenden besprochenen Verfahren verwendet nur einen einzigen Reaktor ohne anschließende Rückführung, auch wenn diese prinzipiell möglich und sinnvoll ist. Es ist nochmals darauf hinzuweisen, daß die Güte der Ab-



trennung einen erheblichen Einfluß auf die Wirtschaftlichkeit haben kann.

Die denkbar einfachste Möglichkeit ist ein Batch-Prozeß. Abgesehen von den in Frage gestellten Anforderungen nach Automatisierbarkeit, Stabilität und hoher Produktivität gehen bei Batch-Ansätzen nach Substratverbrauch die Enzyme und das Coenzym verloren oder müssen erst durch entsprechende Aufarbeitung zurückgewonnen werden. Je teurer die Enzyme sind, umso wichtiger wird ihre Wiederverwendung. Eine häufig angewandte Methode ist der Einsatz immobilisierter Enzyme, die sich nach Ende der

Reaktion auf einfache Weise abtrennen lassen /8,35-40/. Das ATP kann in Batch-Verfahren ca. 100fach regeneriert werden.

Für den kontinuierlichen Betrieb ist eine Rückhaltung in jedem Fall zwingend. Zur Immobilisierung existieren eine Reihe von erprobten Methoden (Abbildung 3) /41/:

- Chemische Methoden
 - a. Covalente Bindung an eine funktionalisierte Polymermatrix
 - b. Copolymerisation von Polymer und Enzymprotein
 - c. Quervernetzung des Enzymproteins
- Physikalische Methoden
 - d. Adsorption an eine Polymermatrix
 - e. Einschluß in eine Polymermatrix
 - f. Einschluß in semipermeable Mikrokapseln
 - g. Einschluß hinter einer semipermeable Membran
 - h. Trennung in Zweiphasensystemen

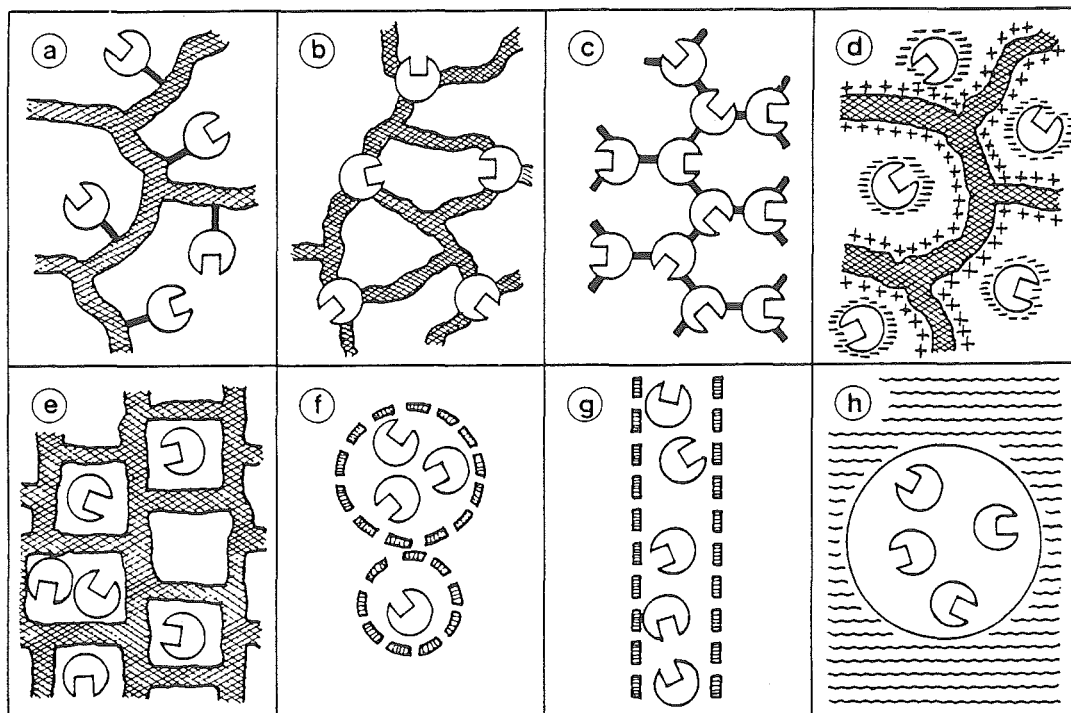


Abbildung 3. Methoden der Immobilisierung für enzymatische Verfahren (zur Aufzählung im Text, Seite 15)

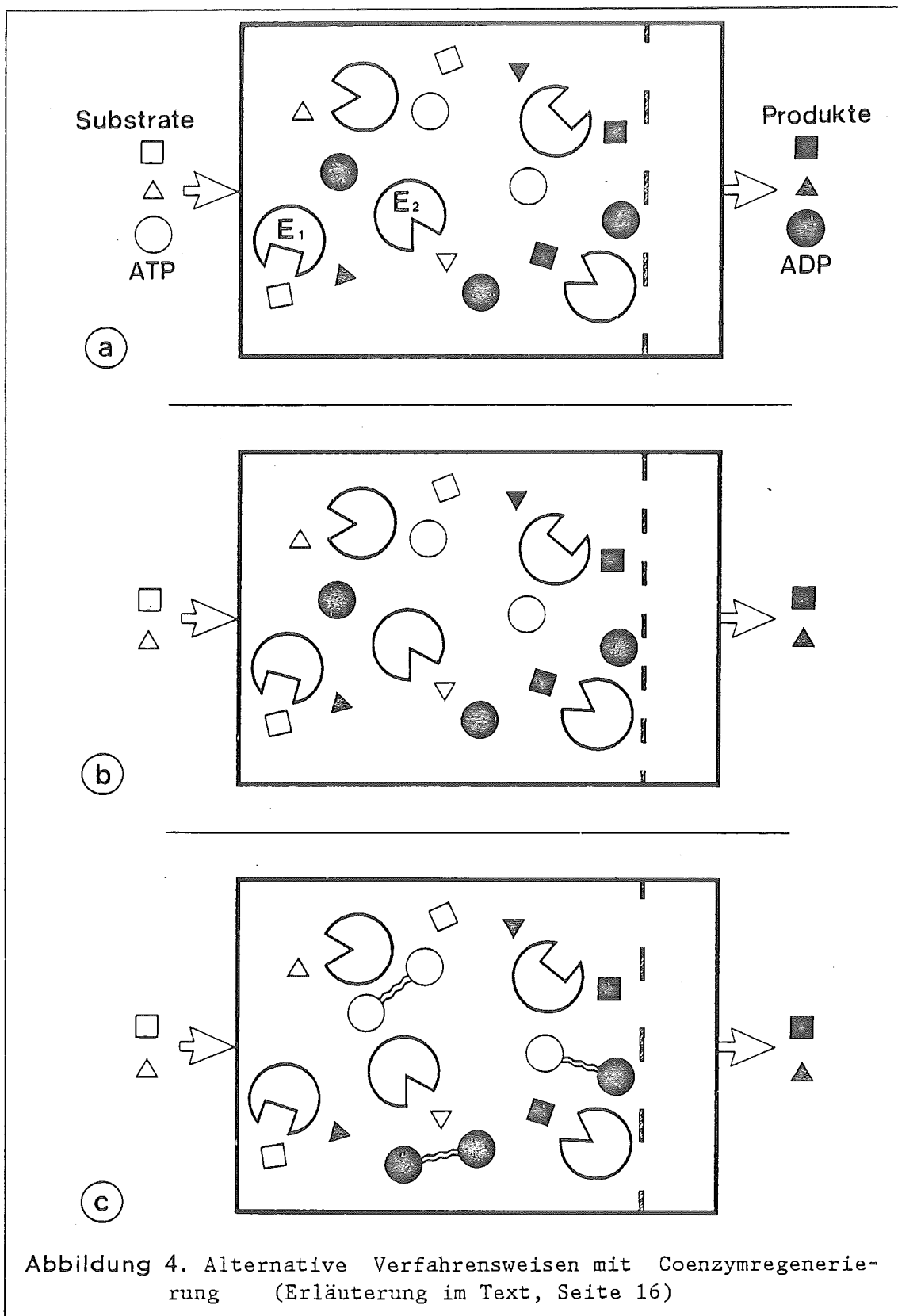
Oft können mehrere Kräfte an der Bindung beteiligt sein, so daß einzelne Methoden nicht immer eindeutig einer der Kategorien zuzuordnen sind.

Für die Anwendung im Technikums- oder Produktionsmaßstab haben sich als dazugehörige Apparate gepackte Säulen bei Trägerfixierung (heterogene Katalyse) und Membranreaktoren für gelöste Enzyme (homogene Katalyse) durchgesetzt. Das Scale-Up von Zweiphasensystemen ist ebenfalls unproblematisch, die Methode hat aber erst in den letzten Jahren Eingang in die Enzymtechnologie gefunden. Die Frage nach dem optimalen Verfahren kann nicht sofort nach den jeweiligen Vor- und Nachteilen der Immobilisierungsmethode entschieden werden. Als wichtigstes Kriterium muß zusätzlich die Eignung für coenzymabhängige Reaktionen erfüllt sein.

Wählt man ein Verfahren, bei dem lediglich die Enzyme durch eine der genannten Methoden zurückgehalten werden, geht das Coenzym mit dem Produkt ab und ist verloren /7,9,10,24,42-45/. Es muß daher laufend mit den Substraten dem Reaktor zugeführt werden (Abbildung 4a). Während der Verweilzeit kommt es zu einigen Zyklen von ATP-Verbrauch und Regenerierung, die erreichte Anzahl von Regenerierschritten liegt hier bei ca. 20 Zyklen. Dies ist mit Sicherheit zu niedrig, da für NAD(H) bei günstigen (enzymkinetischen) Voraussetzungen bereits 10000 Zyklen erreicht werden konnten /46/.

Eine merkliche Steigerung der ATP-Nutzung kann nur erreicht werden, wenn Enzyme und Coenzym solange wie möglich in Kontakt sind. Eine bereits erwähnte Möglichkeit, den Verlust zu verhindern, ist die Coenzymabtrennung aus dem Produktstrom mit Rückführung. Die für Adennucleotide ausgearbeiteten Verfahren erreichen dabei Ausbeuten zwischen 90 und 99% /47/.

Die elegantere Lösung ist die gemeinsame Immobilisierung von Enzymen und Coenzym im Reaktor. Von den beschriebenen Methoden eignen sich keine Trägerfixierungen, da die Beweglichkeit von Enzym und ATP erheblich eingeschränkt ist und die Reaktion zwischen ihnen nahezu unterbunden wäre. Beim Einschluß hinter einer Membran mit einer Auschußgrenze unterhalb des Molekulargewichts des ATP oder Verwendung von entsprechend engporigen Mikrokapseln kann die Katalyse ohne sterische Hinderung stattfinden (Abbildung 4b) /48/. Allerdings wird nicht nur das Coenzym am Verlassen des Reaktors gehindert, sondern auch der Durchgang für die Produkte erfährt einen hohen Widerstand. Der Gebrauchswert beschränkt sich damit auf Produkte mit signifikant kleinerem Molekulargewicht als ATP. Prinzipiell lassen sich auch andere Unterschiede zwischen ATP und Produkt nutzen, um eine selektive Rückhaltung zu erreichen. Solche Versuche bleiben ebenfalls auf einen kleinen Kreis an Anwendungen beschränkt. Der Gebrauch von wäßrigen Zweiphasensystemen ist



nur in wenigen Arbeiten untersucht worden, gilt aber als aussichtsreiche Technik /7,32/.

Das Problem läßt sich umgehen, wenn man das Coenzym so modifiziert, daß seine Größe auf ein den Enzymen vergleichbares Maß angehoben wird. Durch Bindung an ein wasserlösliches Polymer erhält man eine Art 'molekulargewichtsvergrößertes' ATP, das die sichere Abtrennung von Produkten erlaubt (Abbildung 4c). Enzyme und Coenzympolymer sind beispielsweise zusammen durch eine Ultrafiltrationsmembran /49,50/ oder in einer Matrix /51,52/ eingeschlossen. Das Problem dieser Technik besteht im notwendigen Eingriff am Coenzym. Zum einen gibt es im Gegensatz zum Enzymprotein wenige Möglichkeiten zur Funktionalisierung, zum anderen befindet sich die vorgenommene Änderung in unmittelbarer Nähe zum aktiven Zentrum, so daß das Analogon teilweise erheblich von den Eigenschaften des nativen Coenzym abweicht /53,54/. Die Art und Weise der Verknüpfung hat dabei einen erheblichen Einfluß auf die kinetischen Größen, die Enzymaktivitäten können sich dabei sowohl verschlechtern als auch verbessern. Die mit NAD(H) erzielten Ergebnisse mit maximalen Zyklenzahlen von 90000 zeigen, daß sich der Syntheseaufwand für polymergebundenes Coenzym durch das hohe Nutzungspotential aber auch durch die einfache Anwendung in Membranreaktoren bezahlt macht /55/.

Die Leistungsfähigkeit der aufgeführten Verfahrensalternativen ist abschließend in der Tabelle 2 zusammengefaßt.

	batch	Rückhaltung von		
		Enzym	natives ATP	Polymer-ATP
ADP und AMP	++	++	++	+
Anpassungsfähigkeit	-	++	0	++
Coenzymnutzung	0	+	+	++
Katalysator	+	0	+	+
Stabilität	+	++	+	++
Automatisierbarkeit	-	+	+	++
Kontinuierl. Betrieb	0	++	++	++

Tabelle 2. Vergleich der Verfahrensalternativen
(Merkmal (++)leicht (+)gut (0)schwer (-)nicht erfüllbar)

Wie sich zeigt, sind Enzymrückhaltungen sowohl mit nativem als auch mit polymergebundenem ATP für die praktische Anwendung geeignet. Polymergebundenen ATP verspricht die potentiell leistungsfähigsten Verfahren mit hoher Coenzymnutzung und Einfachheit der Durchführung. Hierfür ist ein Membranreaktor der Reaktor der Wahl, denn neben dem Vorteil der homogenen Katalyse von nativen Enzymen und dem ATP-Analogen ohne nennenswerte Transportlimitierung können mit ihm hohe Enzym- und Coenzymkonzentrationen erreicht werden. Ein Aktivitätsverlust von Enzymen oder Coenzymen kann zur Aufrechterhaltung des Betriebszustands durch entsprechende Nachdosierung ausgeglichen werden. Kosten und maximale Konzentrationen sind die begrenzenden Faktoren, die bei zu hoher Desaktivierung Verfahren mit gebundenen Enzymen und nativem ATP geeigneter machen.

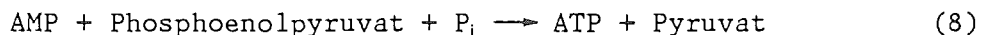
2.3 AUSWAHL EINES ENZYMS ZUR REGENERIERUNG

Nachdem mit dem Membranreaktor ein geeignetes Prinzip vorliegt, ist noch aus der Vielzahl möglicher Reaktionen zur Phosphorylierung von ADP die geeignete zu identifizieren.

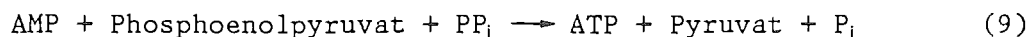
Bei der folgenden Erörterung spielt die Regenerierung von AMP keine Rolle. Diese läuft normalerweise in zwei Stufen über ADP ab, so daß der Phosphorylierung des ADP lediglich die von dem Enzym Adenylat-Kinase katalysierte Reaktion vorgeschaltet ist:



Die vollständige Regenerierung von AMP zu ATP ist damit auf zwei Regenerierschritte ADP zu ATP zurückgeführt. Eine weitere Möglichkeit ergibt sich prinzipiell durch die Enzyme Phosphoenolpyruvat-Synthase (EC 2.7.1.dd) /56/:



und Pyruvat-Phosphatdikinase (EC 2.7.9.1) /57/:



Die Reaktion (9) ist wegen der günstigeren Gleichgewichtslage zu bevorzugen. Allerdings sind bei beiden Enzymen noch keine Anstrengungen unternommen worden, sie in ausreichenden Mengen zu isolieren. Die Kosten für den Phosphatdonator Phosphoenolpyruvat stellen kein Problem mehr dar, da seit einiger Zeit ein günstiger Syntheseweg zur Verfügung

steht /58/. Die Verwendung von Adenylat-Kinase in Verbindung mit einer beliebigen ADP-Phosphorylierung bleibt der zu bevorzugende Weg.

Um die ADP-Phosphorylierung so ökonomisch und so einfach wie möglich zu machen, sollten sowenig Enzyme wie nötig eingesetzt werden. Vorschläge, die Enzyme der Glycolyse einzusetzen, sind zwar durchführbar, doch zeigt sich, daß entsprechende Rohextrakte nur bedingt tauglich sind, da die intermediären Stoffe der Reaktionskette durch die Membran verloren gehen /24/. Als geeignete Enzyme haben sich bislang nur Phosphotransferasen erwiesen.



Obwohl sie einen besonderen Phosphatdonator X-P benötigen, kann die Phosphorylierung in nur einem einzigen Schritt mit einem isolierten Enzym durchgeführt werden. Zur Auswahl kommen Phosphotransferasen mit Reaktionen, deren thermodynamisches Gleichgewicht deutlich auf Seiten der ATP-Bildung liegt (Tabelle 3). Als weitere Faktoren sind die zu Kapitelbeginn (Seite 9) genannten Anforderungen von Verfügbarkeit, Stabilität und Kosten für Enzym und Phosphatdonator zu berücksichtigen. Die Eigenschaften des verbrauchten Phosphatdonators haben bei der Abtren-

Enzyme			Dazugehöriger P-Donator		
	Gleichgewicht K_{eq}	Käufll.	Halbwertszeit (h)	Käufll.	mögl. Kosten [DM/mol]
Pyruvat-Kinase	6610	+		+	39
Acetat-Kinase	400	+	20 h	+	2
Carbamat-Kinase	25	+	2 h	+	10
3-P-Glycerat-Kin.	3450	+		-	
Aspartat-Kinase	2860	-	1.4 h	-	
Creatin-Kinase	105	+	12 d	+	103
Arginin-Kinase	500	+		+	
Ammonium-Kinase	> 18	-		-	3
Polyphosphat-Kin.		-	stabil	+	12 *

Tabelle 3 Mögliche Kinasen zur ATP-Regenerierung und ihre Phosphatdonatoren (* DM/kg)

nung aus dem Produktstrom, seiner Beseitigung oder Rezyklierung Einfluß auf die Prozeßökonomie.

Die niedrige Verfügbarkeit eines Enzyms muß nicht unbedingt zum Ausschneiden aus dem Vergleich führen, wenn die Möglichkeit zur eigenen Isolierung besteht. Bei einer Reihe von Enzymen, die entweder nicht oder nur für Laborzwecke angeboten werden, ist dies der günstigste Weg, zumal ein reines Enzym nicht notwendig ist. Es ist lediglich zu beachten, daß die Preparation weder ATPase-Aktivität noch andere Enzyme, welche unerwünschte Nebenprodukte aus den Substraten und Produkten bilden, enthält. Allerdings sind durch die Art der Enzymquelle und die spezifische Aktivität Grenzen gesetzt. Die Enzymstabilität unter Produktionsbedingungen kann ebenfalls limitierend werden. Screeningprogramme und genetische Techniken können diese Mängel erst nach hohem Aufwand von Zeit und Geld beheben. Von den aufgeführten Enzymen trifft dies auf Creatin-Kinase wegen der tierischen Herkunft sowie auf Ammonium-Kinase und Polyphosphat-Kinase wegen ihrer niedrigen spezifischen Aktivität zu. Weiterhin beeinflußt eine mögliche Inhibierung bei hohen Substrat- und Produktkonzentrationen die Wahl des Enzyms.

Alle in Frage kommenden Phosphatdonatoren unterliegen in wäßriger Lösung einer Hydrolyse. Abhängig von der Zusammensetzung der Reaktorlösung findet man Halbwertszeiten von einigen Stunden. Für 4-Phospho-L-Aspartat und Carbamylphosphat können diese mit weniger als zwei Stunden für eine technische Anwendung zu kurz sein. Carbamylphosphat läßt sich allerdings *in situ* erzeugen /59/.

Die Kosten für den Phosphatdonator bilden einen der wichtigsten Anteile an den Gesamtkosten. Von den in der Tabelle aufgeführten 9 Phosphatverbindungen sind nur 6 im Handel erhältlich, deren Preise mit Ausnahme von Polyphosphat über dem von ATP liegen. Eine 1976 erstellte Untersuchung zeigt, daß die eigene Synthese bei Acetylphosphat, Phosphoramidat und Carbamylphosphat hier erhebliche Vorteile bringt und unter Umständen erst die wirtschaftliche Voraussetzung schafft /60/. Auf einen günstigen Syntheseweg für Phosphoenolpyruvat wurde bereits hingewiesen.

Die nichtenzymatische Bildung von Carbamylphosphat *in situ* aus Phosphat und Cyanat ist nicht unproblematisch. Da die meisten ATP abhängigen Enzyme Magnesiumkonzentrationen bis zu 10 mmol/l benötigen, wird das Löslichkeitsprodukt der Magnesiumphosphate schon bei kleinen Phosphatkonzentrationen erreicht. Zusätzlich erschwerend wirkt sich die langsame Bildungsgeschwindigkeit aus.

In der Summe der aufgeführten Kriterien erscheinen Acetat-Kinase und Pyruvat-Kinase als die derzeit geeignetesten Enzyme. Beide Regenerienzyme haben ihre spezifischen Anwendungen. Sind beispielsweise höherer Umsatz oder Stabilität des Phosphatdonators erwünscht bzw. erforder-

lich, wird Pyruvat-Kinase das Enzym der Wahl sein, auch wenn die Synthese von Acetylphosphat einfacher und preisgünstiger als Phosphoenolpyruvat ist. Wie sich noch in Kapitel 6 zeigen wird, ist die Aktivität des polymer- gebundenen ATP-Derivats das ausschlaggebende Kriterium zur Wahl des Regenerierenzym.

Es muß betont werden, daß bessere Enzyme oder neue Synthesewege für Phosphatdonatoren andere ökonomische Wege eröffnen können. Beispielsweise kann die Nutzung billiger Metaphosphate durch Polyphosphat-Kinase in absehbarer Zeit als interessante Alternative hinzukommen /61/.

Das für diese Arbeit ausgewählte Verfahren ist damit klar beschrieben. Abschließend seien seine Merkmale nochmals zusammengestellt:

Die Regenerierung wird enzymatisch zusammen mit der ATP verbrauchenden Reaktion im gleichen Reaktor durchgeführt (interne Regenerierung). Das Coenzym ist an ein lösliches Polymer gebunden und wird mit den Enzymen durch eine Ultrafiltrationsmembran zurückgehalten. Der Reaktor wird kontinuierlich betrieben.

Auch wenn die Leistungsfähigkeit im einzelnen von den eingesetzten Enzymen und dem polymergebundenen ATP-Derivat abhängt, können die zu Beginn erstellten Anforderungen grundsätzlich erfüllt werden.

3.0 DAS KONZEPT ENZYMMEMBRANREAKTOR

Das gesamte katalytische System von ATP-Verbrauch und Regenerierung muß für den kontinuierlichen Betrieb immobilisiert werden. Da ATP als Transportmetabolit zwischen verschiedenen Enzymen dient, können sie ihre volle Aktivität nur bei uneingeschränkter Beweglichkeit, also im gelösten Zustand erreichen. Membranreaktoren können hier vorteilhaft eingesetzt werden, alle Reaktanden sind gelöst und homogen verteilt. Um das Coenzym mit Hilfe von Ultrafiltrationsmembranen zurückzuhalten, wird es an ein wasserlösliches Polymer mit ausreichendem Molekulargewicht gebunden.

Die ersten Versuche, Ultrafilter in kontinuierlichen Reaktoren zur Enzymrückhaltung zu verwenden, stammen aus dem Jahr 1968 /62/. Das Prinzip der homogenen Katalyse in Enzymmembranreaktoren hat sich seitdem in einer Reihe von Applikationen insbesondere mit Hydrolasen bis hin zum industriellen Prozeß entwickeln können /55,63/.

3.1 ULTRAFILTRATION

Zur Auslegung und zum optimalen Betrieb von Membranreaktoren sind die charakteristischen Gegebenheiten der Ultrafiltration zu beachten.

Das Rückhaltevermögen von Membranen für einen bestimmten Stoff wird durch das Verhältnis von Filtrat- und Retentatkonzentration charakterisiert. Die Retention ist dabei definiert als:

$$R = 1 - \frac{c_F}{c_R} \quad (11)$$

mit	R	-	Retention (einer Stoff/Membrankombination)
	c_F	mol/l	Stoffkonzentration im Filtrat
	c_R	mol/l	Stoffkonzentration im Retentat

Die Gleichung gilt exakt nur bei ideal dünnen Lösungen. Für Membranen wird in der Regel das Molekulargewicht eines noch zurückgehaltenes Moleküls als Trenngrenze angegeben. Dieser sogenannte Cut-off ist allerdings nicht verbindlich definiert. Es ist in jedem Fall sinnvoll, eine Retentionsmessung unter den aktuellen Betriebsbedingungen durchzuführen.

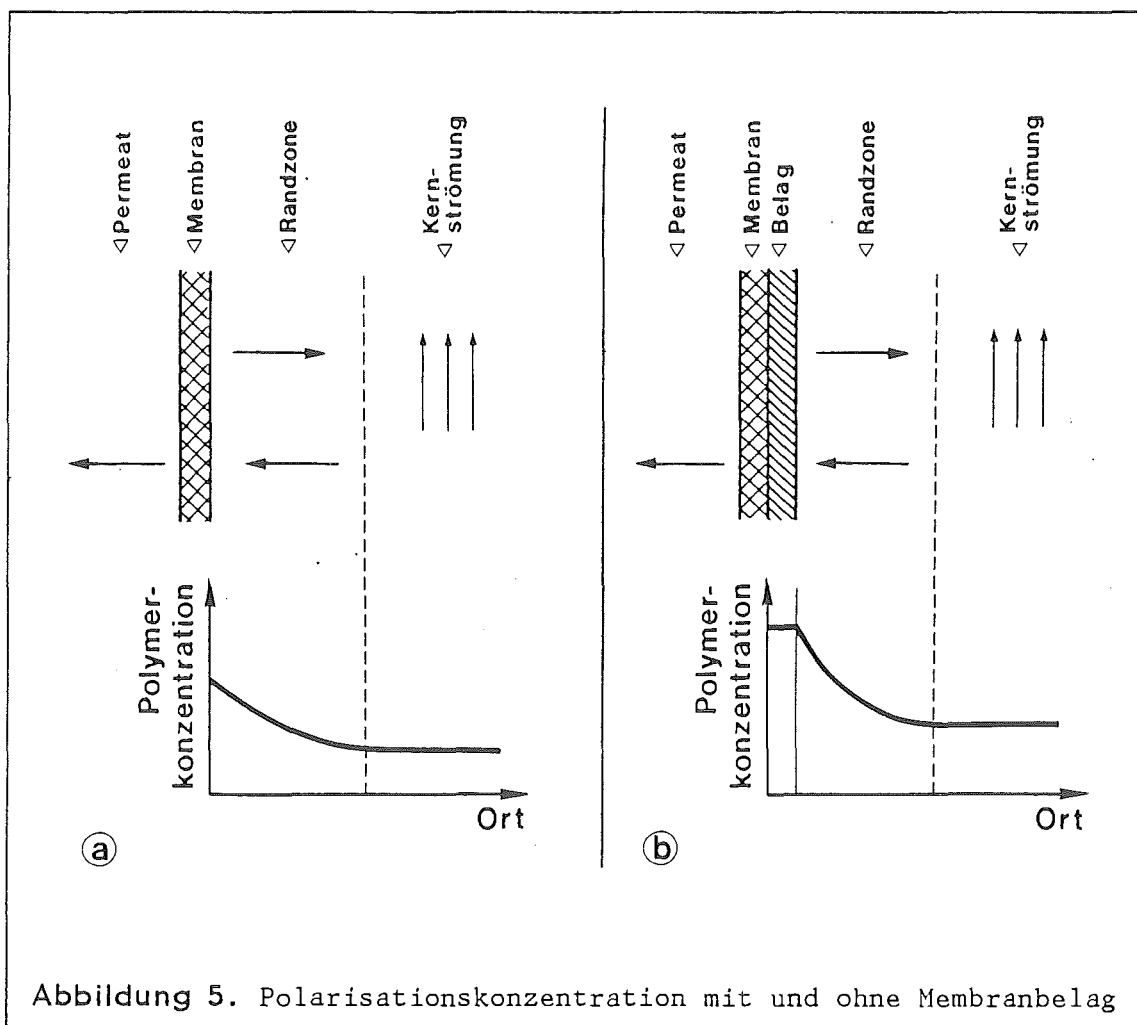
Die Retention ist durch die Porengröße und die Größenverteilung gegeben. Durch das in diesem Abschnitt später angesprochene Phänomen der Membranbelagbildung wird die Retention nachhaltig beeinflusst.

Um einen Rührkessel über lange Zeit betreiben zu können, ist ein hoher Retentionswert erforderlich. Als Massenbilanz für Enzym und polymergebundenes Coenzym gilt:

$$\frac{dc}{dt} = -D \times c_F = -D \times (1 - R) c_R \quad (12)$$

mit D 1/s Verdünnungsrate

Der Verlust ist damit exponentiell mit der Betriebszeit verknüpft. Selbst bei einem effektiven Retentionswert von 0.995 sind nach 500 Verweilzeiten bereits über 91% der Anfangskonzentration verloren.



Der Fluß durch eine Membran ist proportional zur vorhandenen Druckdifferenz und wird durch die Größe des hydraulischen Widerstands bestimmt:

$$F = \frac{\Delta p}{W} \quad (13)$$

mit	F	m ³ /m ² s	Fluß
	Δp	Pa	Druckdifferenz über die Membran
	W	Pa s/m	Hydraulischer Widerstand

Der hydraulische Widerstand setzt sich dabei aus einer für eine gegebene Membran charakteristischen Konstante und einem durch den aktuellen Betriebszustand bestimmten Anteil zusammen. Letzterer steigt mit zunehmender Stoffkonzentration und mit steigendem Fluß. Ursache ist das Phänomen der sogenannten Konzentrationspolarisation. Der mit dem Fluß an die Membran geführte Stoff wird dort zurückgehalten und konzentriert

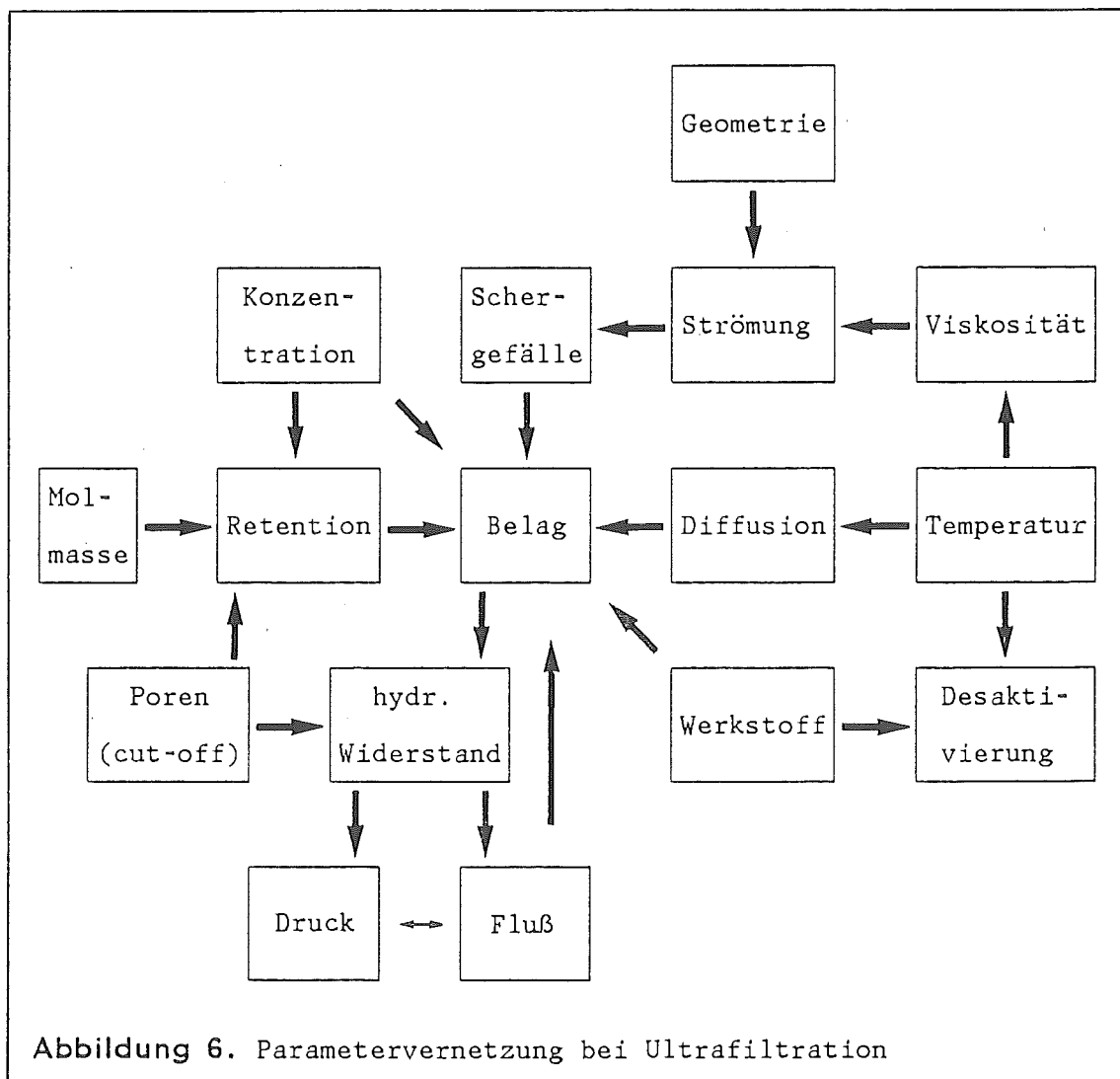


Abbildung 6. Parametervernetzung bei Ultrafiltration

sich. Im Gleichgewicht von Fluß und Rücktransport durch stellt sich innerhalb einer Randzone ein Konzentrationsprofil ein (Abbildung 5a). Im Extremfall hoher Konzentrationen und/oder hohem Fluß wird vor der Membran Sättigungskonzentration erreicht. Ausgefallene Stoffe wie beispielsweise das Enzymprotein können auf diese Weise zu einem Belag der Membranoberfläche führen und so den hydraulischen Widerstand erheblich erhöhen (Abbildung 5b).

Konzentrationspolarisation ist allerdings nicht das einzige Phänomen, welches einen Membranbelag verursacht. Adsorption von Protein am Membranmaterial kann zu erheblicher Belagbildung führen. Es ist wesentlich, daß der Rücktransport von niedergeschlagenem Stoff groß genug ist. Andernfalls bestimmt ausschließlich die Größe der Rückführung den Fluß. Druck und Permeabilität haben keinen Einfluß mehr. Erst Maßnahmen die auf eine Erhöhung des Rücktransports hinzielen - dazu zählt die Erzeugung höherer Scherraten und Turbulenzen entlang der Oberfläche durch stärkeres Rühren, hohe Strömungsgeschwindigkeit oder auch Einbauten über der Membranoberfläche bzw. die Addition fester Körper in die Reaktorlösung sowie eine Verstärkung der Diffusion durch höhere Temperatur - führen zu erhöhtem Fluß bzw. erniedrigtem Reaktordruck.

Bei der Auswahl einer geeigneten Membran ist Interaktionen zwischen Enzymprotein und Membranmaterial, namentlich hydrophoben Wechselwirkungen und elektrischer Oberflächenladung, große Bedeutung zuzumessen. Reine Adsorptionserscheinungen sind dabei nur ein Teil der Wirkung. So wird die Desaktivierung der Enzymaktivität in erheblichem Maß von den Materialeigenschaften beeinflusst. Allerdings trifft dies nicht nur auf die Membran, sondern in gleichem Umfang auf die anderen Oberflächen im Reaktor zu.

Eine Übersicht über das Zusammenwirken der beschriebenen Einflußgrößen der Ultrafiltration ist in der Abbildung 6 zusammengestellt. Es wird dabei deutlich, daß sich Trennwirkung und hydrodynamische Gegebenheiten nicht voneinander lösen lassen.

3.2 ENZYMKINETIK

Das reaktionstechnische Verhalten des Enzymmembranreaktors kann nicht ohne Kenntnis der Kinetik des in Frage kommenden Enzymsystems beschrieben werden. Zusätzlich beeinflusst die Kinetik die Auswahl des Reaktortyps.

Die wichtigsten Faktoren, die die Geschwindigkeit enzymkatalysierter Reaktionen beeinflussen, sind:

- Enzymkonzentration,
- Konzentration von Substraten und Produkten,
- Konzentration von Inhibitoren und Aktivatoren,
- pH,
- Ionenstärke und
- Temperatur

Sie gilt es experimentell zu untersuchen. Als die - abgesehen von der Enzymkonzentration - direkt die Produktivität beeinflussende Variablen kommt den Konzentrationen von Substraten, Produkten und Effektoren die größte Bedeutung zu. Da die übrigen Bedingungen mit Rücksicht auf Restriktionen wie Stabilität konstant gehalten werden, sind sie für den Ablauf der Reaktion die bestimmende Größe.

Bei ATP abhängigen Enzymen ist die Aktivität im allgemeinen an die Anwesenheit eines Metallions gebunden. In diesen Fällen ist das wahre Substrat nicht das ATP selbst, sondern ein Substrat-Metall Komplex. Es handelt sich um Komplexe von ATP bzw. ADP mit zweiwertigen Metallionen,

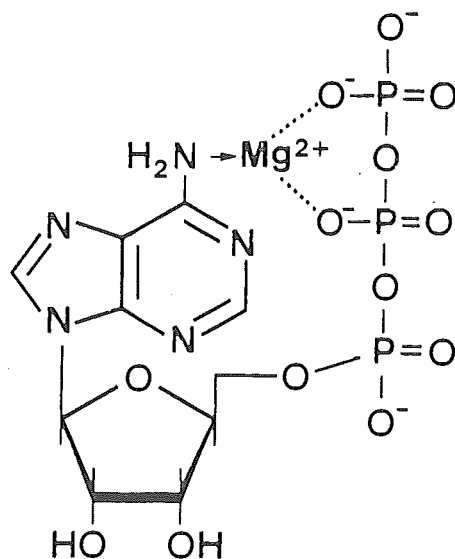


Abbildung 7. Koordination von ATP mit einem zweiwertigen Kation
(nach /64/)

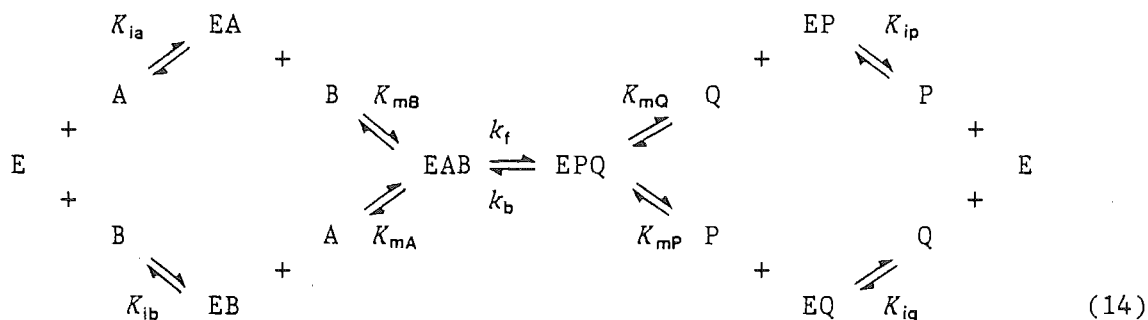
bei denen die Sauerstoffe der Phosphatgruppen und Stickstoff des Adensins die Liganden stellen /64/ (Abbildung 7). Wenn das Enzym nicht nur den Komplex, sondern auch das freie ATP (ADP) bindet, kommt es zu einer kompetitiven Inhibierung. Zu den Gleichgewichten der Enzymreaktion kommt noch das der Komplexbildung. Beispielsweise für den Magnesium-ATP Komplex:



Ein Überschuß des Ions kann dafür sorgen, daß alles ATP (ADP) dem Enzym komplexiert zur Verfügung steht. Allerdings ist bei einigen Enzymen eine Inhibierung durch freies Metallion zu beachten.

Bei den in Frage stehenden Phosphotransferasen handelt es immer um Zwei-Substrat Reaktionen. Das kinetische Verhalten richtet sich dabei nach dem spezifischen Mechanismus des Enzyms und der Art der entstehenden Enzym-Reaktand-Komplexe. Man unterscheidet dabei, ob die Reihenfolge der Substratbindung am Enzym bei der Bildung des ternären Enzym-Substrat-Komplexes beliebig (Random-Systeme) oder festgelegt (Ordered-Systeme) ist. Ein Mechanismus, bei dem ein Produkt zwischen der Bindung von Substraten abgeht und ein 'substituiertes' Enzym zurückläßt, wird als Ping-Pong bezeichnet. Hybride Formen sind möglich.

Die enzymatische Reaktion läuft über eine Vielzahl von Zwischenstufen ab. Für jeden Komplex lassen sich Reaktionsgeschwindigkeiten für Bildung und Zerfall angeben. Als ein bei Kinasen häufig anzutreffendes Modell sei hier exemplarisch ein Random-System skizziert:



mit	E	Enzym
	A, B	Substrate
	P, Q	Produkte
	K_{m} mol/l	Bindungskonstanten
	k_{f} 1/s	Geschwindigkeitskonstante der zentralen Enzymkomplexe

Ist die Umwandlung der zentralen Komplexe [EAB] und [EPQ] der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, resultiert die Nettogeschwindigkeit aus der Differenz von Hin- und Rückreaktion:

$$V = k_f [EAB] - k_b [EPQ] \quad (15)$$

mit V kat/l Reaktionsgeschwindigkeit
 $[...]$ mol/l Konzentration des jeweiligen Stoffes oder Komplexes

Bezeichnet man mit $[E]_t$ die Gesamtmenge Enzym

$$[E]_t = [E] + [EA] + [EB] + [EAB] + [EPQ] + [EP] + [EQ] \quad (16)$$

ergeben sich als maximal erreichbare Reaktionsgeschwindigkeiten für beide Richtungen:

$$V_{\max}^f = k_f [E]_t \quad (17)$$

$$V_{\max}^b = k_b [E]_t \quad (18)$$

Aus den einzelnen Gleichgewichten des Kinetikmodells und Verknüpfung der letzten drei Gleichungen ergibt sich der zur späteren Rechnung erforderliche Ausdruck für die Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion der in Betracht gezogenen Konzentrationen:

$$V = \frac{\frac{[A][B]}{K_{ia} K_{mB}} V_{\max}^f - \frac{[P][Q]}{K_{ip} K_{mQ}} V_{\max}^b}{1 + \frac{[A]}{K_{ia}} + \frac{[B]}{K_{ib}} + \frac{[P]}{K_{ip}} + \frac{[Q]}{K_{iq}} + \frac{[A][B]}{K_{ia} K_{mB}} + \frac{[P][Q]}{K_{ip} K_{mQ}}} \quad (19)$$

Die kinetischen Parameter werden in der Regel durch Messung von Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten ermittelt. Durch systematische Variation von Substrat-, Produkt-, oder Effektorkonzentration kann das Modell auf seine hinreichende Gültigkeit überprüft, gegebenenfalls verifiziert und die einzelnen Modellkonstanten ermittelt werden. Hin- und Rückreaktion lassen sich auf diese Weise getrennt untersuchen.

Werden Inhibierungen gemessen, so läßt sich ein entsprechender Enzymkomplex im Modell berücksichtigen. Die Gleichung der Reaktionsgeschwindigkeit wird im Nenner durch den dazugehörigen Term erweitert (siehe dazu Kapitel 7.2).

Das thermodynamische Gleichgewicht ist erreicht, wenn der Zähler in Gleichung 19 zu Null wird, also die Geschwindigkeit von Hin- und Rückreaktion gleich ist. Daraus folgt der als Haldane-Gleichung bekannte Zusammenhang zwischen den kinetischen Konstanten und der Gleichgewichtskonstanten K_{eq} :

$$K_{eq} = \frac{[P][Q]}{[A][B]} = \frac{V_{\max}^b K_{ia} K_{mB}}{V_{\max}^f K_{ip} K_{mQ}} \quad (20)$$

3.3 ALLGEMEINES ZUR REAKTORAUSLEGUNG

Bei kontinuierlichen Reaktoren entsteht die Fragestellung nach dem optimalen Reaktortyp. Dabei ist die Betrachtungsweise von zwei Grenzfällen üblich, dem ideal durchmischten Rührkessel (CSTR) und dem idealen Rohrreaktor (PFTR). Beide sind durch die Größe der Rückvermischung charakterisiert. Der ideale Rührkessel wird als vollständig durchmischt betrachtet, während für den Rohrreaktor eine ideale Propfenströmung ohne Rückvermischung angenommen wird.

Wie bereits eingangs des letzten Kapitels erwähnt worden ist, hat die Kinetik einen starken Einfluß auf die Wahl des Reaktortyps. Es kann daher nie von vornherein die optimale Größe der Rückvermischung angegeben werden. Um den Einfluß kinetischer Parameter zu demonstrieren, sollen folgende drei einfache Einsubstrat-Modelle miteinander verglichen werden:

Ideale Michaelis-Menten-Kinetik:

$$V = \frac{V_{\max} [A]}{K_m + [A]} \quad (21)$$

Produktinhibierung:

$$V = \frac{V_{\max} [A]}{K_m(1 + [P]/K_i) + [A]} \quad (22)$$

Substratüberschußinhibierung:

$$V = \frac{V_{\max} [A]}{K_m + [A] + [A]^2/K_i} \quad (23)$$

mit K_m mol/l Michaelis-Menten-Konstante
 K_i mol/l Inhibierungskonstante

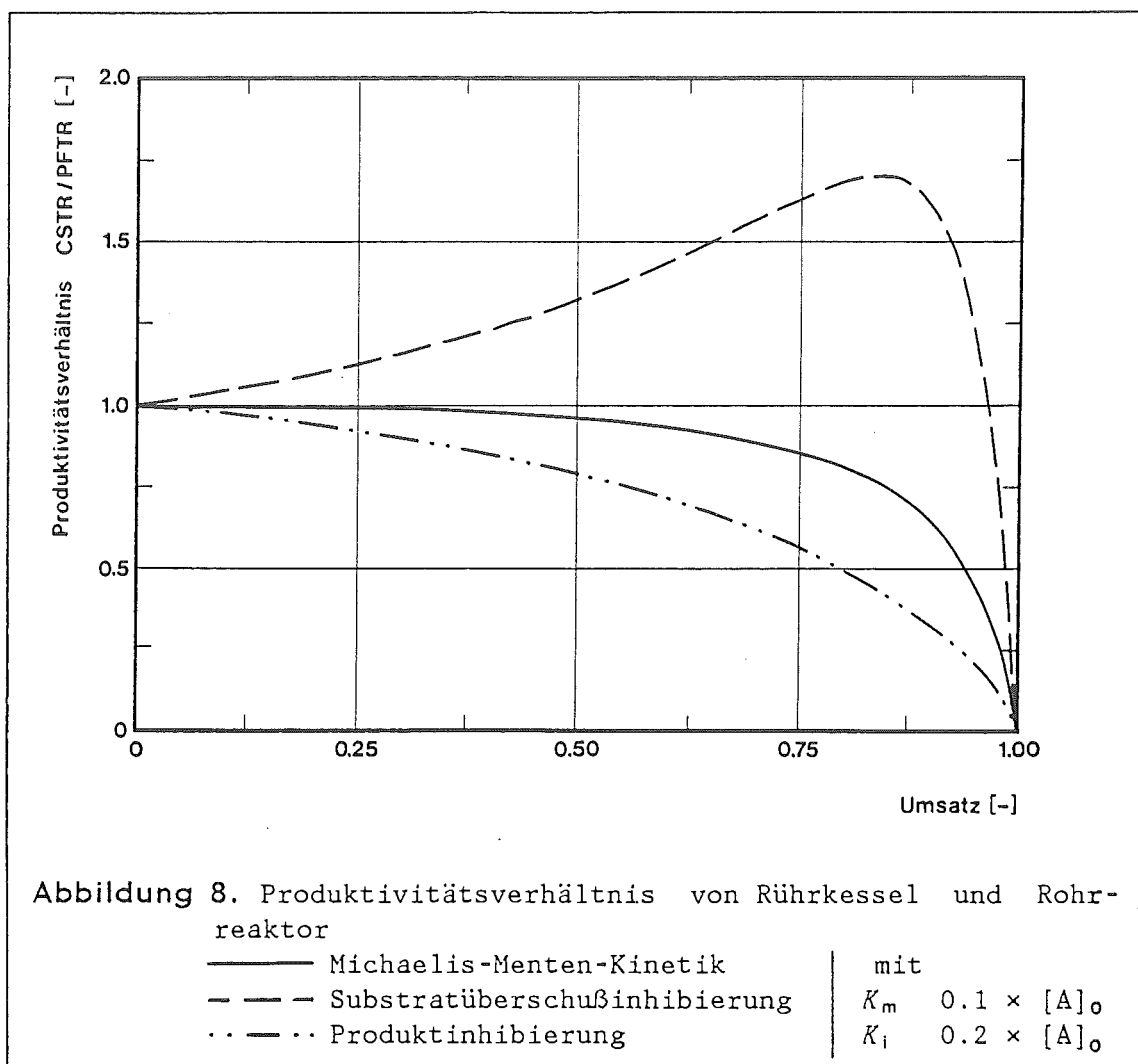
Mit den Gleichungen für die Reaktorproduktivität beim Rührkessel

$$P(\text{CSTR}) = V \quad (24)$$

und für den Rohrreaktor

$$\begin{aligned} & \text{(aus } P = ([A]_0 - [A]) \times D \text{ und } d[A]/dt = V) \\ P(\text{PFTR}) &= ([A]_0 - [A]) \int_{[A]}^{[A]_0} \frac{d[A]}{V} \end{aligned} \quad (25)$$

ergibt sich (siehe Beispiel Abbildung 8), daß der bei höherer Substratkonzentration arbeitende Rohrreaktor bei hohem Umsatz der zu bevorzugende Typ ist. Sein Vorteil wächst dabei mit zunehmender Produktinhibierung. Enzyme die Substratinhibierung zeigen, werden in der Regel im Rührkessel bei niedriger Substratkonzentration am effektivsten genutzt.



Während bei Rührkesseln Reaktion und Ultrafiltration in einem Apparat integriert sind, werden Rohrreaktoren entweder als Kaskade oder Strömungsrohr mit nachgeschalteter Ultrafiltrationseinheit und der Rückführung des Enzyms betrieben.

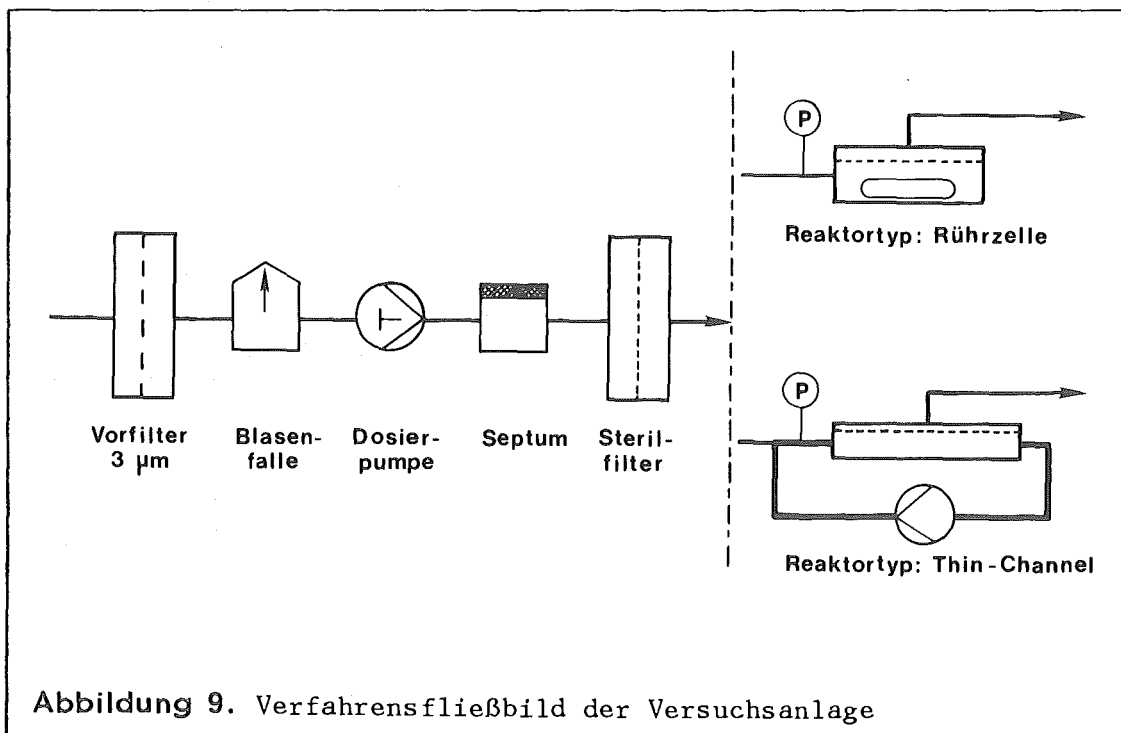
4.0 APPARATIVER AUFBAU

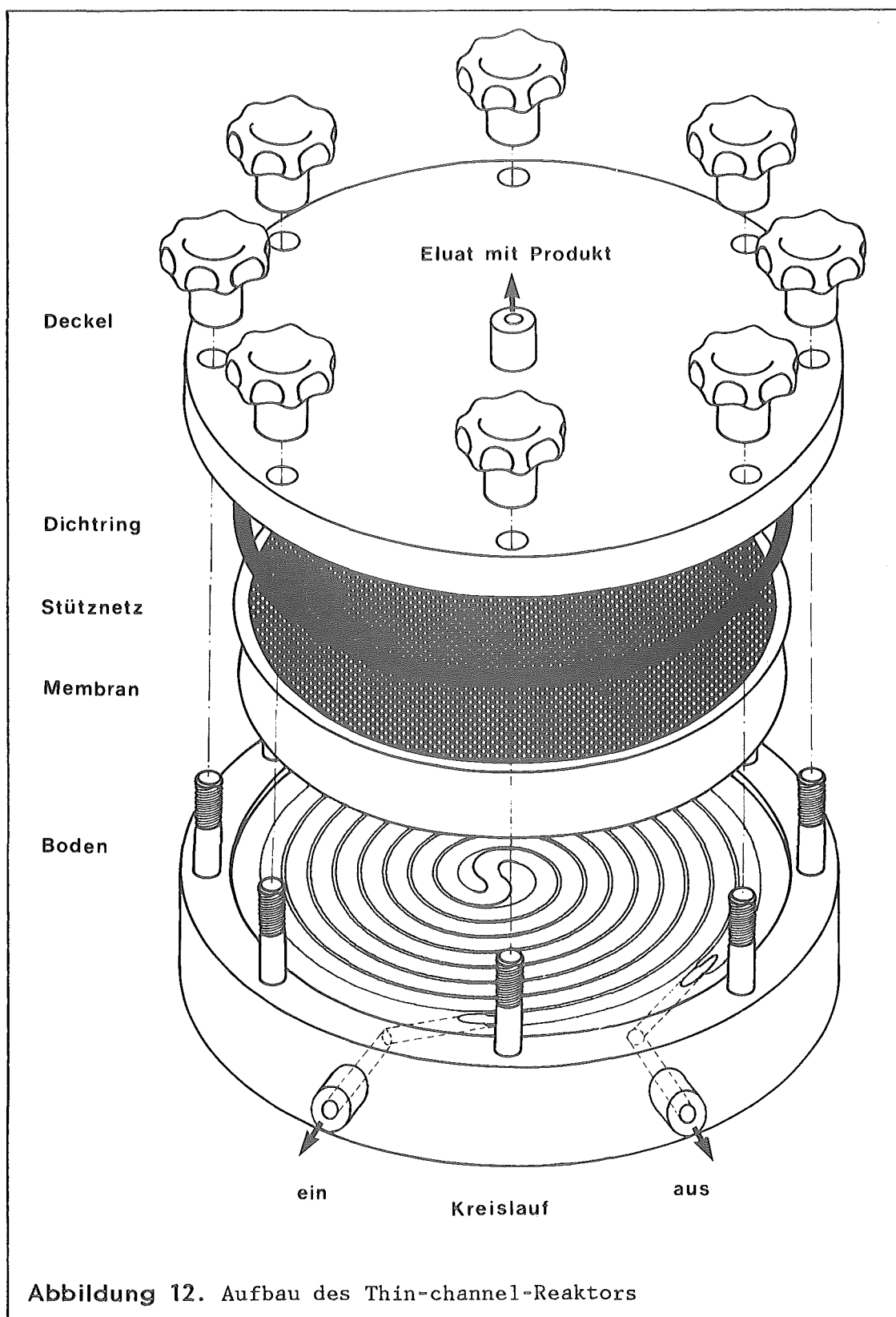
Abbildung 9 zeigt das Verfahrensfließbild der Versuchsanlage, wie sie zur Durchführung der kontinuierlichen enzymatischen Synthese eingesetzt wurde. Eine Aufstellung der verwendeten Geräte ist im Anhang C.1 aufgelistet.

4.1 SUBSTRATDOSIERUNG

Die Substratlösung befindet sich in einem auf konstant 4°C gekühlten Vorratsgefäß. Wegen der Hydrolyse des Acetylphosphat wurde die Lösung alle 12 Stunden erneuert.

Als Pumpe wird eine hochkonstant arbeitende Wechselkolbenpumpe eingesetzt. Mit ihr wird die Verdünnungsrate unabhängig vom Systemdruck genau eingestellt. In der Saugleitung befinden sich ein Vorfilter sowie eine Blasenfalle. Der Filter hat einen Porendurchmesser von 3 µm und schützt die Kolbensitze vor Schäden durch Schmutzteilchen, vor allem aber ist er für eine die Versuchsdauer (> 800 h) anhaltene Standzeit des





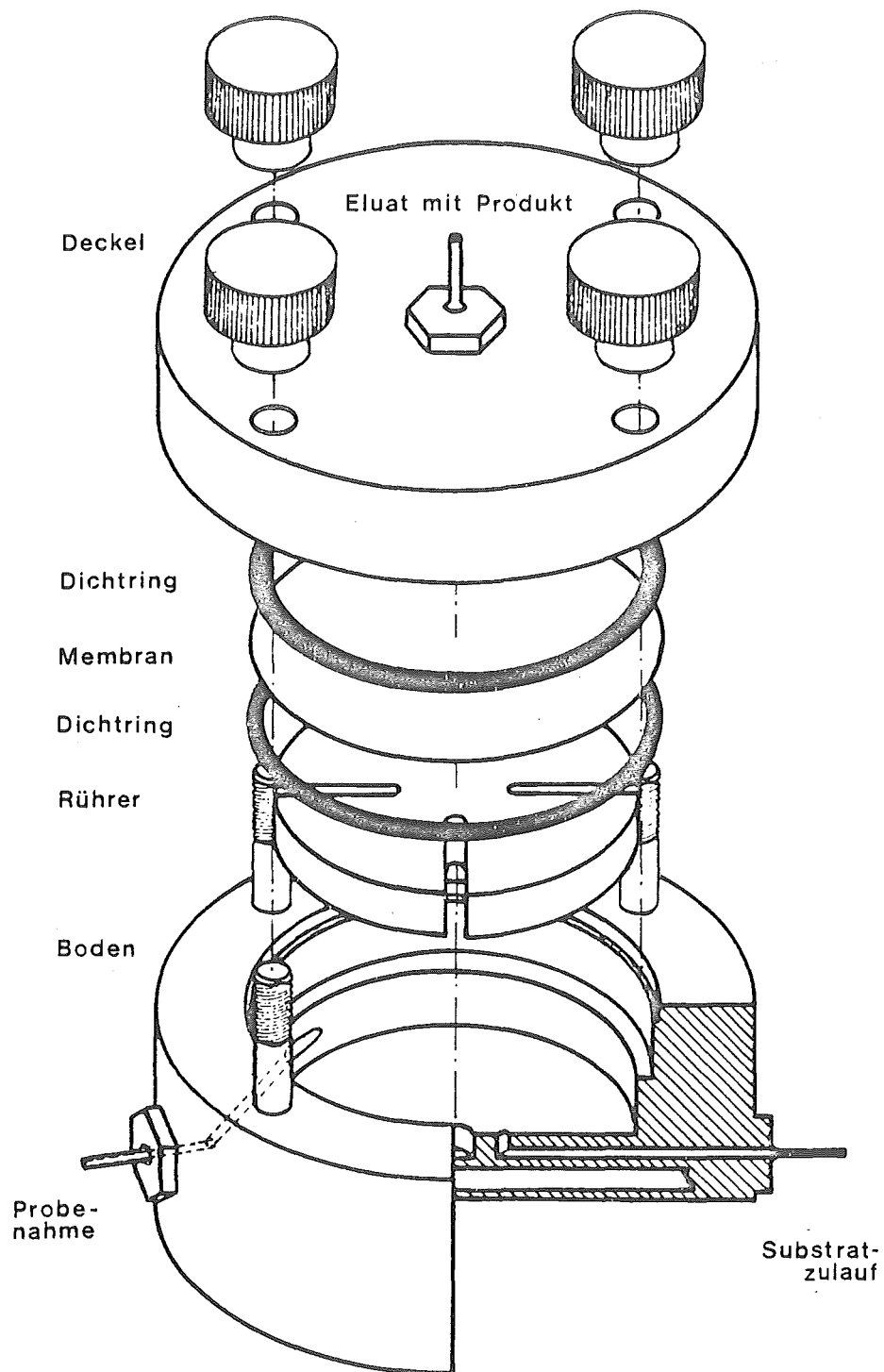


Abbildung 13. Aufbau des Rührzellenreaktors

Hier befindet sich der Druckaufnehmer zur Kontrolle des Membrandrucks. Durch die zweite Bohrung ist eine Hohlneedle in das Reaktorinnere eingeführt und ermöglicht die Entnahme von Reaktorproben.

Beide Reaktoren sind mit einem Hohlboden versehen, der es gestattet mit Hilfe eines Umwälzthermostaten eine konstante Betriebstemperatur einzustellen. Als Ultrafiltrationsmembran wurde eine Celluloseacetat-Membran mit einem nominellen Cut-off von 5000 Daltons (Fa. Amicon, Witten, Typ YM5) ausgewählt. Alle mit Reaktorlösung in Berührung kommenden Teile sind aus Edelstahl 1.4571 oder den Kunststoffen Polyacryl und PVC gefertigt. In Tabelle 4 sind weitere Daten zu den Reaktoren angegeben. Ihr Aufbau ist aus den Abbildungen 12 und 13 ersichtlich.

Bevor Produktionsversuche gestartet werden, wird die betriebsbereit aufgebaute Anlage mit einer 0.1%igen Peressigsäurelösung chemisch sterilisiert. Die Lösung wird mindestens 12 Stunden im Kreislauf durch Dosierstrecke und Reaktor gepumpt. Nach weiteren 12 Stunden Spülen mit destilliertem Wasser wird Substratlösung eingepumpt. Das Coenzym wird

Thin-Channel

Reaktorvolumen	32.8 ml	Pumpgeschwindigkeit	5..20 l/h
Membrandurchmesser	150 mm	Kanallänge	2.2 m
genutzte Fläche	132 cm ²	Kanalbreite	6.0 mm
Betriebstemperatur	25 °C	Kanaltiefe	1.0 mm
		(hydr. Durchmesser	1.7 mm)

Rührzelle

Reaktorvolumen	11.4 ml	Rührerdrehzahl	300 Upm
Membrandurchmesser	62 mm		
genutzte Fläche	23 cm ²		
Betriebstemperatur	25 °C		

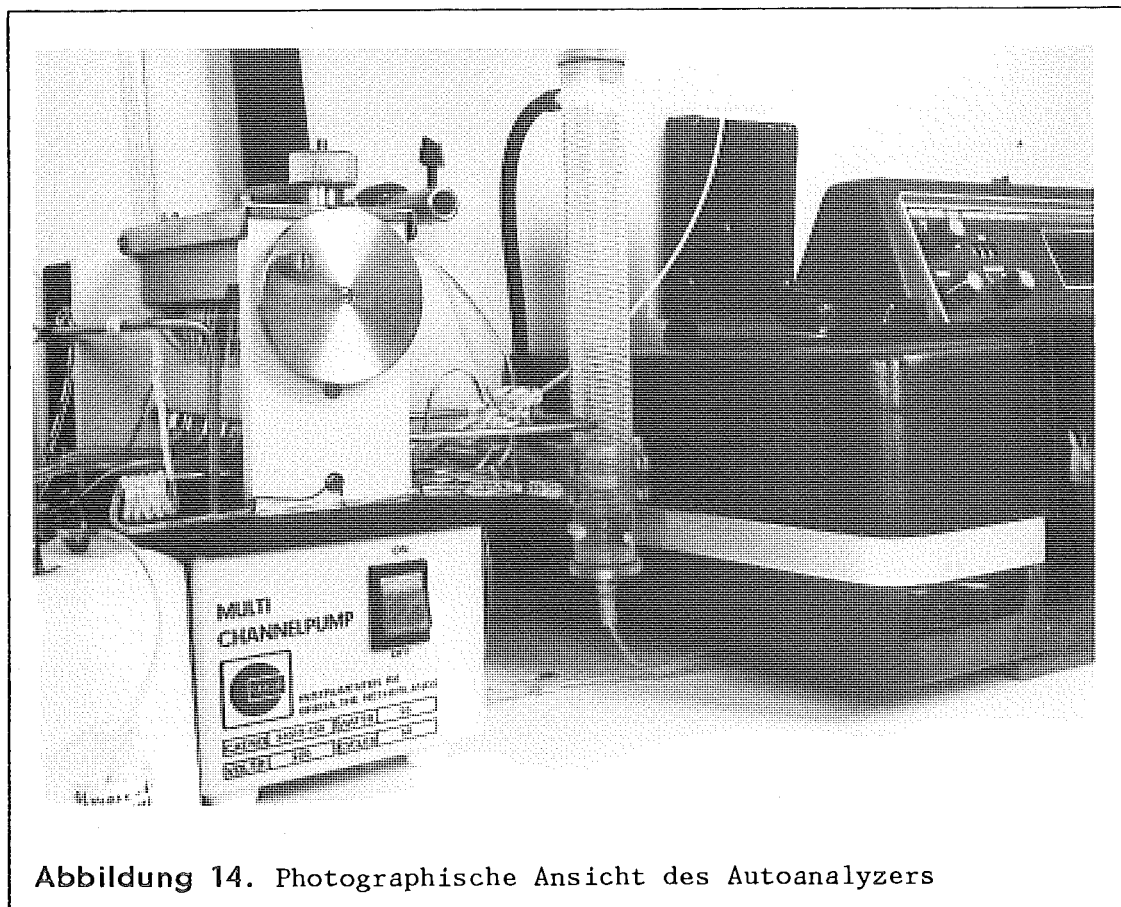
Tabelle 4. Daten zu den verwendeten Enzymmembranreaktoren

durch einen Sterilfilter eingespritzt und der Versuch mit der Zugabe der Enzyme gestartet.

4.3 KONTINUIERLICHE ANALYTIK

Zur kontinuierlichen Messung des Umsatzes findet ein Autoanalyzersystem Anwendung. Es gewährleistet eine Anzeige der aktuellen Produktkonzentration nach einer Totzeit von 13 Minuten.

Am Einlaß kann zwischen Reaktorausgang und einer Standardlösung umgeschaltet werden. Eine Vielkanalschlauchpumpe saugt die Lösung parallel mit allen anderen Strömen an. Der Probestrom wird zunächst mit Puffer verdünnt. Die Verdünnung durchläuft nochmals die Pumpe und wird jetzt mit den Nachweisreagentien vermischt. Nach einer temperierten Verweilstrecke gelangt das ausreagierte Gemisch in die Durchflußküvette des Photometers. Abbildung 14 gibt eine Ansicht der Analysetechnik wieder.



Die Prinzipien und seine Funktion werden im Kapitel 5.6 erläutert.

Die Registrierung der Meßdaten erfolgt analog auf einem Schreiber. Neben der Extinktion wird der Reaktordruck aufgezeichnet. An einem Digitaldruckerausgang des Photometers ist über eine BCD-Schnittstelle ein Prozeßrechner PDP 11/34 angeschlossen. Die Datenerfassung erlaubt mit Hilfe der in zeitlichen Abständen zugegebenen Standardlösung eine einfache Auswertung der Extinktionswerte (siehe Abschnitt 5.6.2).

5.0 ANALYTIK

Die genaue Untersuchung der ablaufenden Reaktionen erfordert eine Reihe geeigneter Methoden zur Erfassung der Reaktanden. Im folgenden Abschnitt werden Meßmethoden für folgende Fragestellungen beschrieben:

1. Aktivitätsüberprüfung ausgewählter Enzyme, sowohl bei ATP-verbrauchenden als ATP-bildenden Reaktionen
2. Charakterisierung der im Membranreaktor eingesetzten Enzyme
3. Konzentrationsbestimmung von polymergebundenem ATP und ADP
4. Messung der Enzymaktivitäten zur Kontrolle des Membranreaktors
5. kontinuierliche Konzentrationsbestimmung des Produkts am Reaktorauslauf

Allgemein ist anzumerken, daß bei Konzentrationsangaben von Polymer-ATP/ADP ausschließlich die enzymatisch aktive Menge gemeint ist.

5.1 AKTIVITÄTSBESTIMMUNG AUSGEWÄHLTER ENZYME

Zweck der Enzymtests ist es, die Aktivität einzelner Enzyme auf die Akzeptanz der ATP-Analoga zu überprüfen und im Ergebnis die erreichbare maximale Reaktionsgeschwindigkeit im Verhältnis zum nativen Coenzym abschätzen. Da die jeweiligen Reaktionspartner oder Reaktionsprodukte einer physikalischen oder chemischen Meßmethode nur schwer zugänglich sind, ist es sinnvoll eine der Komponenten enzymatisch zu bestimmen. Für den überwiegenden Teil der Enzyme stehen bereits erprobte, enzymatische Methoden zur Verfügung /65/. Die Enzymaktivitäten werden durch Kopplung mit einer nachgeschalteten NAD(H) bzw. NADP(H) abhängigen Indikatorreaktion aus der Änderung der Extinktion bei 340 nm photometrisch ermittelt. Zweckmäßigerweise werden alle Tests in der Photometerküvette durchgeführt. Die Verwendung der existierenden Enzymtests ist im vorliegenden Fall allerdings nicht immer möglich, da auf die besonderen Eigenschaften der ATP-Analoga Rücksicht genommen werden muß.

Bei einer Vielzahl von Kinasen sind zwei Kopplungsschemata üblich, die das entstehende Nukleotid nachweisen. Zur Messung von ATP bildenden Reaktionen werden Hexokinase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase eingesetzt:

Enzym	getestete Reaktion
Hexokinase EC 2.7.1.1	Glucose + ATP \longrightarrow Glucose-6-P + ADP
Gluconat-Kinase EC 2.7.1.12	Gluconat + ATP \longrightarrow Gluconat-6-P + ADP
NAD-Kinase EC 2.7.1.23	NAD + ATP \longrightarrow NADP + ADP
Glycerokinase EC 2.7.1.30	Glycerin + ATP \longrightarrow Glycerin-3-P + ADP
Pyruvat-Kinase EC 2.7.1.40	Phosphoenolpyruvat + ADP \longrightarrow Pyruvat + ATP
Acetat-Kinase EC 2.7.2.1	Acetylphosphat + ADP \longrightarrow Acetat + ATP
Carbamat-Kinase EC 2.7.2.2	Carbamylphosphat + ADP \longrightarrow Carbamat + ATP
3-Phosphoglycerat-Kinase EC 2.7.2.3	Glycerat-3-P + ATP \longrightarrow Glycerat-1,3-P ₂ + ADP
Creatin-Kinase EC 2.7.3.2	Creatinphosphat + ADP \longrightarrow Creatin + ATP
Adenylat-Kinase EC 2.7.4.3	2 ADP \longrightarrow AMP + ATP
Nucleosidmonophosphat-Kinase EC 2.7.4.4	Uridinmonophosphat + ATP \longrightarrow Uridindiphosphat + ADP
Nucleosiddiphosphat-Kinase EC 2.7.4.6	Uridintriphosphat + ADP \longrightarrow Uridindiphosphat + ATP
γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase EC 6.3.2.2	Glutamat + Cystein + ATP \longrightarrow γ -Glutamyl-Cystein + ADP + P _i

Tabelle 5. Aktivitätstests mit Polymer-ATP/ADP

gekoppelte Nachweisreaktionen

Glucose-6-P + NADP \longrightarrow Gluconat-6-P + NADPH

Gluconat-6-P + NADP \longrightarrow Ribulose-5-P + CO₂ + NADPH

NADP + Glucose-6-P \longrightarrow NADPH + Gluconat-6-P

Glycerin-3-P + NAD \longrightarrow Dihydroxyaceton-P + NADH

Pyruvat + NADH \longrightarrow Lactat + NAD

ATP + Glucose \longrightarrow Glucose-6-P + ADP

Glucose-6-P + NADP \longrightarrow Gluconat-6-P + NADPH

ATP + Glucose \longrightarrow Glucose-6-P + ADP

Glucose-6-P + NADP \longrightarrow Gluconat-6-P + NADPH

Glycerat-1,3-P₂ + NADH \longrightarrow Glycerinaldehyd-3-P + NAD

ATP + Glucose \longrightarrow Glucose-6-P + ADP

Glucose-6-P + NADP \longrightarrow Gluconat-6-P + NADPH

ATP + Glucose \longrightarrow Glucose-6-P + ADP

Glucose-6-P + NADP \longrightarrow Gluconat-6-P + NADPH

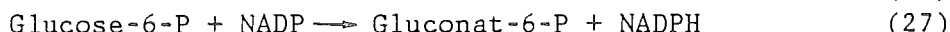
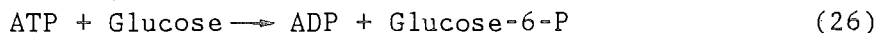
UDP + Phosphoenolpyruvat \longrightarrow UTP + Pyruvat

Pyruvat + NADH \longrightarrow Lactat + NAD

UDP + Phosphoenolpyruvat \longrightarrow UTP + Pyruvat

Pyruvat + NADH \longrightarrow Lactat + NAD

Chromatographische Bestimmung des Dipeptids /66/



Zur Messung der ATP verbrauchenden Reaktionen verwendet man Pyruvat-Kinase als Hilfsenzym und Lactat-Dehydrogenase als Indikatorenzym:



Die zu messende Kinasereaktion muß stets geschwindigkeitsbestimmend sein. Für alle Hilfsreaktionen und für die Indikatorreaktion muß das Verhältnis von maximaler Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} und der Michaelis-Menten-Konstante K_m deutlich höher als beim zu bestimmenden Enzym sein. Um in den Tests ATP-Derivate verwenden zu können, muß folglich eine ausreichende Aktivität gewährleistet sein. Wie sich bei der Prüfung von Hexokinase und Pyruvat-Kinase zeigt (siehe Kapitel 6.2), kann lediglich für Hexokinase in allen Fällen ausreichende Aktivität nachgewiesen werden. Zur Vermeidung dieses Fehlers ist es sinnvoll, die Enzymtests auf das in Gleichung 10 als X bzw. in der Rückreaktion X-P bezeichnete Produkt abzustimmen. Die für die getesteten Enzyme verwendeten Nachweisreaktionen sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Um die unterschiedliche Lage der mit polymergebundenem ATP maximal erreichbaren Reaktionsgeschwindigkeit zu berücksichtigen, wurde jeder Test bei drei unterschiedlichen Konzentrationen (0.5, 1.0, 1.5 mmol/l) durchgeführt und mit der mit nativem ATP bei 1.5 mmol/l gemessenen Geschwindigkeit verglichen. Diese Vorgehensweise ist kein Ersatz für umfangreiche kinetische Messungen, sondern sie soll ein erstes Urteil über die Tauglichkeit der Enzyme für die vorgesehene Anwendung ermöglichen.

Nähere Angaben zu den durchgeführten Enzymtests sind im Anhang A.1 beigelegt.

Die zur Verfügung stehenden polymergebundenen Coenzymderivate sind ausnahmslos Triphosphat. Das zur Messung einiger Enzyme notwendige ADP kann auf einfache Weise durch eine ATP verbrauchende Reaktion erzeugt werden. Näheres ist im Kapitel 5.3.1 beschrieben.

5.2 UNTERSUCHUNG DER IM MEMBRANREAKTOR EINGESETZTEN ENZYME

Zur reaktionstechnischen Beschreibung und Untersuchung des Membranreaktors müssen die Reaktionsgeschwindigkeiten der beteiligten Enzyme in Abhängigkeit verschiedener Parameter bekannt sein. Neben den allgemein

die Enzymaktivität beeinflussenden Größen wie Temperatur und pH sind Substrat- und Produktkonzentrationen sowie eventuelle Effektoren zu überprüfen.

Die durch numerische Differentiation der Konzentrations-Zeit-Verläufe erhaltenen Reaktionsgeschwindigkeiten werden als Anfangsreaktionsraten angegeben. Diese resultieren aus den auf Startbedingungen extrapolierten Werten. Falls nicht anders vermerkt, wurden alle Messungen in 0.2 mmol/l Trispuffer bei pH 7.6 und einer Temperatur von 25°C durchgeführt. Als Coenzymkonzentration ist ausschließlich die enzymatisch meßbare Menge aufgeführt.

Bei den hier untersuchten Enzyme handelt es sich um Acetat-Kinase aus *E. coli* und Hexokinase aus *S. cerevisiae*.

5.2.1 STABILITÄTSUNTERSUCHUNGEN

Die gleichen im folgenden beschriebenen Verfahren zur Bestimmung der Enzymaktivitäten wurden darüberhinaus zur Verfolgung der Stabilität in Standproben verwendet. Die Zusammensetzung der Proben entsprach einer zu 70% umgesetzten Reaktorlösung. Anhang A.2 gibt die einzelnen Konzentrationen wieder.

Die Stabilität der polymergebundenen Coenzymderivate wurden in Trispufferlösungen ermittelt.

5.2.2 HEXOKINASE

Das Reaktionsschema des Tests ist bereits im vorigen Kapitel mit den Reaktionsgleichungen 26 und 27 angegeben. Der Test ist in allen Einzelheiten mit der dort beschriebenen photometrischen Bestimmung identisch (dazugehöriger Anhang A.1).

5.2.3 ACETAT-KINASE

Zur Bestimmung von kinetischen Parametern wurde im Fall der Acetat-Kinase neben dem kontinuierlichen Test ein Batch-Test durchgeführt. Der kontinuierliche Test entspricht dem im Abschnitt 5.1 beschriebenen photometrischen Test. Der Batch-Test wurde vor allem dann verwendet, wenn Fragestellungen mit Polymer-ADP bearbeitet wurden. Er bietet die Sicherheit, daß gegenseitige Beeinflussungen mit Hilfsenzymen und Reagenzien ausgeschlossen sind.

Der Reaktionsansatz wird in einem thermostatisierten Gefäß mit 3 ml durch Zugabe des Enzyms gestartet. In Abständen von 20 oder 30 Sekunden gezogene Proben werden mit 2 M HCl abgestoppt. Die Säuremenge ist so bemessen, daß der resultierende pH kleiner 2 wird. Die Acetat-Kinase wird dabei irreversibel deaktiviert. Die Probe wird mit NaOH neutralisiert und die ATP-Konzentration nach der im Abschnitt 5.3 beschriebenen Methode bestimmt. Aus der zeitlichen Zunahme während der ersten 2 Minuten der Reaktion wird durch lineare Regression /67/ die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt.

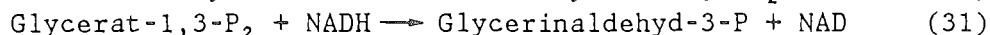
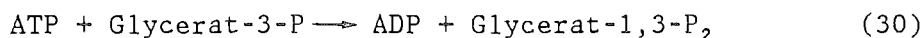
Vor allen kontinuierlichen Messungen oder Batch-Tests wurde die Acetat-Kinase mit Dithiothreitol ca. 20 min inkubiert. Dies bewirkt nicht nur eine starke Zunahme der Aktivität sondern vermag sie vor allem über den Versuchszeitraum zu stabilisieren. Die Endkonzentration Dithiothreitol im Test betrug 2 mmol/l. Die Magnesiumkonzentration wurde der jeweiligen ADP-Konzentration so angepaßt, daß das ADP weitestgehend als Mg-Komplex vorliegt (vgl. Kapitel 7.1).

Der kontinuierliche Test fand nur bei der Bestimmung der Temperaturabhängigkeit und bei der Messung während Stabilitätsuntersuchungen Anwendung. In allen anderen Fällen wurde dem Batch-Test der Vorzug gegeben. Die Bedingungen sind dem Anhang A.2 zu entnehmen.

5.3 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON ATP UND ADP

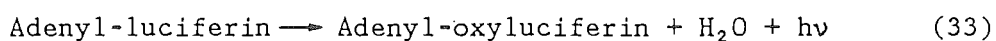
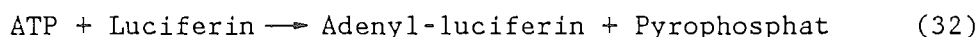
Sowohl für ATP als auch ADP existieren erprobte Methoden /65/. Da die zu untersuchenden Lösungen eine definierte Zusammensetzung haben, sind die Anforderungen an einen Nachweistest im vorliegenden Fall nicht sehr hoch. Allerdings muß sowohl natives als auch polymergebundenes ATP bzw. ADP bestimmt werden können. Zur enzymatischen Bestimmung von ATP-Konzentrationen stehen drei Methoden zur Verfügung:

1. Bestimmung mit 3-Phosphoglycerat-Kinase und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase:



Diese Methode versagt bei Einsatz von Polymer-ATP. 3-Phosphoglycerat-Kinase besitzt gegenüber den getesteten ATP-Derivaten keine Aktivität (siehe auch Kapitel 6.2).

2. Bestimmung mit Luciferase:



Biolumineszenz als Indikator für ATP gilt als hochspezifische und die empfindlichste Meßmethode. Versuche mit einem Luciferinpräparat aus *Photinus pyralis* ergaben jedoch nur Konzentrationen von weniger als 1% der mit Hexokinase und Glucose-6-P-Dehydrogenase bestimmten Werte. Der ADP- und AMP-Gehalt der Proben erschwerte zusätzlich die Durchführung der Messung.¹

3. Bestimmung mit Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (Reaktionen 26 und 27):

Dieser Test hat sich bezüglich des polymergebundenen Coenzym als die einzig zuverlässige Methode erwiesen. Anstelle der für NADP spezifischen Dehydrogenase aus Hefe wird in einer Reihe von Messungen das Enzym aus *Leuconostoc mesenteroides* zusammen mit NAD verwendet. Sowohl Enzym als auch NAD sind kostengünstiger. Bei den vorliegenden Endpunktbestimmungen, d.h. die Reaktionen laufen bis zum völligen ATP-Verbrauch, sind kinetische Unterschiede der Glucose-6-P-Dehydrogenasen ohne Einfluß auf das Meßergebnis. Die Tabelle im Anhang A.3 gibt die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes wieder.

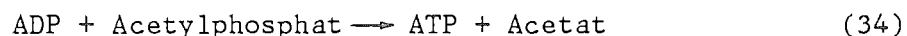
Zur enzymatischen Bestimmung von ADP wird meistens Pyruvatkinase zusammen mit Lactatdehydrogenase verwendet (Reaktionen 28 und 29). Wie bereits auf Seite 44 erwähnt, scheidet Pyruvatkinase für den Nachweis von Polymer-ADP aus. Eine weitere ADP-Bestimmung nutzt Adenylatkinase:

¹ Herrn Dr. Schimz, Institut für Biotechnologie 1 der KFA Jülich, sei an dieser Stelle für seine Unterstützung bei den Lumineszenzmessungen gedankt.



Das entstandene ATP wird mit dem Hexokinase-Test gekoppelt. Die Reaktion läuft solange, bis alles ADP zu AMP umgesetzt ist. Setzt man die Adenylat-Kinase einem abreagierten ATP-Test zu, erhält man die Summe von ADP- und ATP-Konzentration. Jedoch versagt Adenylat-Kinase ebenfalls bei polymergebundenem Coenzym.

Stattdessen wurde das in der Probe vorhandene Polymer-ADP mit Acetat-Kinase zu ATP phosphoryliert:



und in einem zweiten Schritt gemeinsam mit vorhandenem ATP gemessen. Bevor die umgesetzte Lösung im Hexokinasetest verwendet werden kann, muß allerdings die Acetat-Kinase-Aktivität entfernt worden sein, um einen zyklischen NAD Verbrauch zu verhindern. Die ADP-Konzentration errechnet sich aus der Differenz zur vorangegangenen ATP-Messung. Zur Zusammensetzung des verwendeten Reaktionsansatzes sei ebenfalls auf den Anhang A.3 verwiesen.

5.4 DARSTELLUNG VON POLYMER-ADP

Zu diesem Zweck wurde eine in Agarose immobilisierte Hexokinase verwendet. Eine Polymer-ATP-Lösung wird mit ausreichenden Mengen Glucose und Magnesium versetzt und mit der Hexokinase einige Stunden unter Rühren stehengelassen. Die Agaroseperlen werden in einer einfachen Laborzentrifuge abgetrennt und zur späteren Wiederverwendung in 3 molarer Ammoniumsulfatlösung gekühlt aufbewahrt. Die ADP-Lösung kann direkt in den Enzymtests verwendet werden. Lediglich bei hohen Konzentrationen wird sich der Glucose-6-phosphat-Gehalt durch die aus der Glucose-6-P-Dehydrogenasereaktion resultierenden hohen Leerwerte störend bemerkbar machen und muß durch Diafiltration abgetrennt werden.

5.5 MESSUNG DER ENZYMAKTIVITÄTEN ZUR KONTROLLE DES MEMBRANREAKTORS

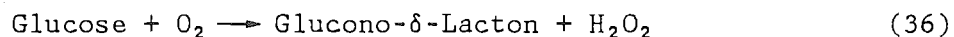
Um die Desaktivierung der im Reaktor befindlichen Enzyme zu messen, wird eine Probe von ca. 50 µl entnommen. Die Einzelaktivitäten können nun nicht nach den oben angegebenen Methoden gemessen werden, da die Re-

aktorlösung hohe Konzentrationen des Produktes Glucose-6-phosphat enthält, welche den Nachweis mittels Glucose-6-P-Dehydrogenase verhindert. Wird ein anderes Produkt im Reaktor erzeugt, kann im Falle der Acetat-Kinase ohne weiteres der Hexokinasetest verwendet werden. Auf der Seite des produktbildenden Enzyms, in diesem Fall Hexokinase, besteht dagegen die Störung durch vorliegendes Produkt. Die anzuwendenden Test müssen daher entstehendes ADP bzw. ATP auswerten.

Da in den Tests natives Coenzym verwendet wird, lassen sich die im vorigen Kapitel 5.1 angegebenen Möglichkeiten nutzen. Die Hexokinaseaktivität kann mit Pyruvat-Kinase und Lactat-Dehydrogenase (Reaktionen 28 und 29), die Acetat-Kinase durch Kopplung mit 3-Phosphoglycerat-Kinase und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Reaktionen 30 und 31) erfaßt werden. Bevor die Reaktorprobe im einzelnen Test verwendet werden kann, muß jedoch das jeweils andere Enzym ausgeschaltet werden. Andernfalls kommt es zu einer Konkurrenzreaktion zu den Hilfs- und Indikatorreaktionen. Die selektive Unterdrückung wird durch eine vorgeschaltete Probenbehandlung erreicht, bei der das Substrat der Konkurrenzreaktion verbraucht wird. Vor dem Hexokinasetest wird das Acetylphosphat mit Hydroxylamin zerstört:



Beim Acetatkinasetest erfolgt der vorherige Glucoseverbrauch durch Glucose-Oxidase:



Die genauen Angaben zur Probenbehandlung und zu Konzentrationen finden sich im Anhang A.4.

5.6 KONTINUIERLICHE KONZENTRATIONSBESTIMMUNG DES PRODUKTS AM REAKTORAUSLAUF

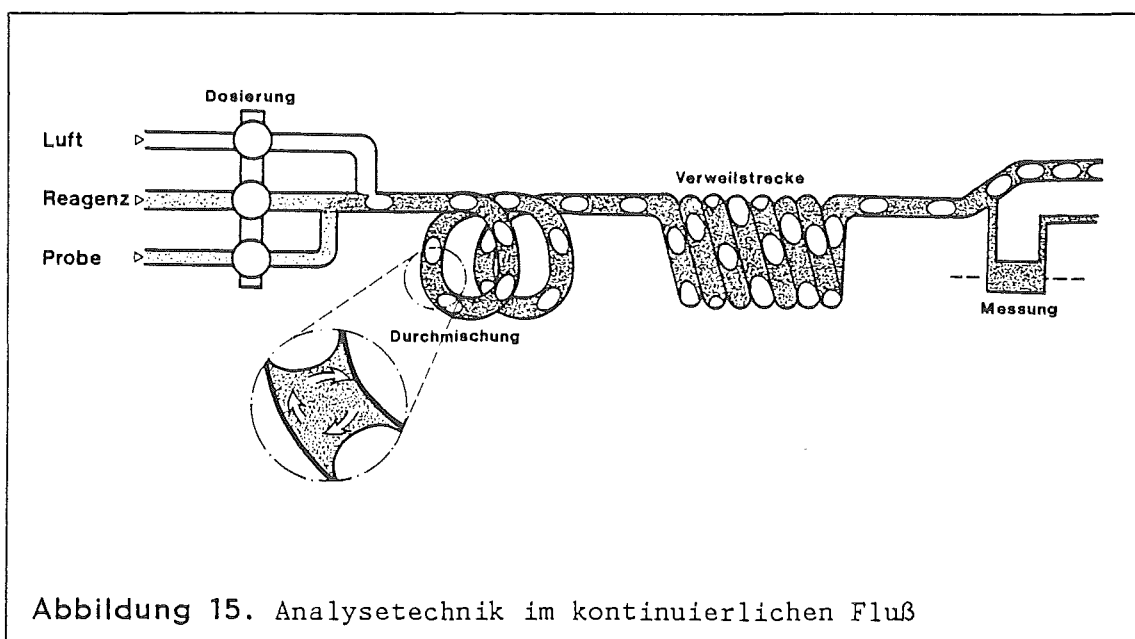
5.6.1 AUTOANALYZERTECHNIK

Bei einem kontinuierlich laufendem Prozeß ist es naheliegend, eine Kontrolle entsprechend dem Ablauf des Prozesses durchzuführen, also eine kontinuierliche Analytik, die das Produkt am Reaktorausgang automatisch bestimmt. Die Messung von Acetat oder verbliebendem Acetylphosphat, wäre eine geeignete Methode, um unabhängig von der aktuellen Synthese den Umsatz zu bestimmen. Beispielsweise sind die Auswertung

der pH-Änderung bzw. des Verbrauchs an Lauge bei pH-statistischer Betriebsführung oder die photometrische Messung von Acetylphosphat als Fe(III)-Acetylhydroxamsäure /65/ geeignete Verfahren. Jedoch berücksichtigt diese Vorgehensweise nicht die spontane Hydrolyse des Acetylphosphats. Abhängig von pH, Temperatur und Magnesiumkonzentration schwankt dessen Halbwertszeit zwischen 5 und 20 Stunden /68/, so daß sich der Zerfall bei Reaktorverweilzeiten von über einer Stunde deutlich bemerkbar machen kann.

Es ist daher sinnvoll, den Umsatz anhand des mit ATP erzeugten Produkts zu messen. Eine direkte physikalische Meßmethode ist wohl nur bei wenigen Produkten möglich. Stattdessen sind in der Regel spezifische Methoden vorhanden, um Konzentrationen in einzelnen Proben bestimmen zu können. Zu ihrer Automatisierung sind eine Reihe von Techniken entwickelt.

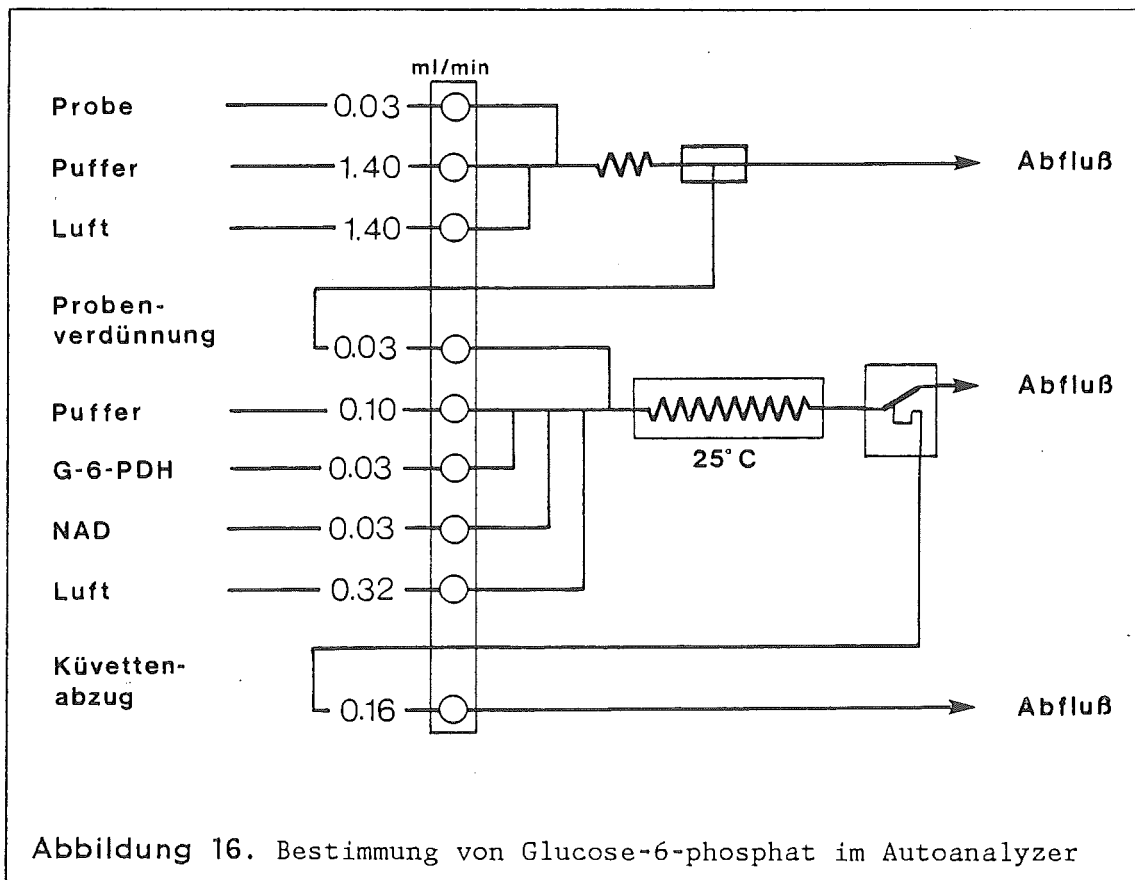
Neben einer Mechanisierung konventioneller manueller Arbeitstechniken, hat sich die automatische Bestimmung im kontinuierlichen Fluß durchgesetzt (Abbildung 15). Die Analyse wird in einem Schlauchsystem ausgeführt, in das Probe und Reagenzien nebeneinander eingepumpt werden. Im kontinuierlichen Fluß wird vermischt, inkubiert und photometrisch gemessen. In regelmäßigen Abständen werden Luftblasen in das Schlauchsystem injiziert, um eine Rückvermischung zu vermeiden. Die Kompartimentierung des Stromes erlaubt darüberhinaus eine einfache Vermischung von Probe und Reagenz in spiralförmigen Glasrohren. In jeder Windung wird ein Flüssigkeitselement einmal umgewälzt. Die Inkubation erfolgt während des Durchlaufs in einem temperierten Wasserbad. Dabei bestimmt die Länge der Strecke die geforderte Inkubationsdauer. An-

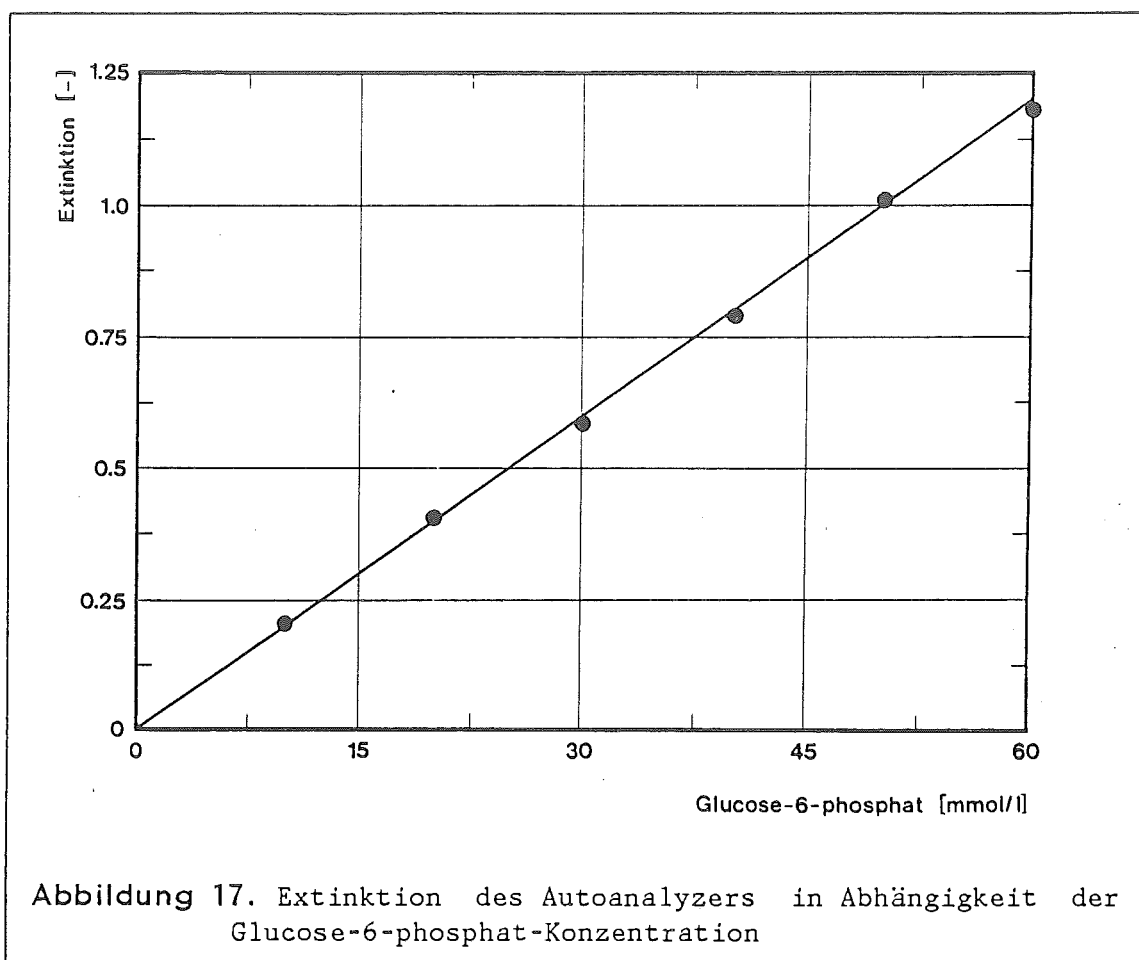


schließlich tritt der Flüssigstrom in eine Durchflußküvette, wo die Luftblasen unmittelbar vor dem Strahlengang in einem T-Stück abgetrennt werden.

Bei enzymatischen Nachweisen kann eine Kostensenkung durch Trägerfixierung des Enzyms erreicht werden. Das Gemisch wird nicht luftsegmentiert, sondern durchfließt eine gepackte Säule, in der die Nachweisreaktion abläuft. Auch wenn die Immobilisierung von Enzymen mit einigem Aufwand verbunden ist, ist dieses Verfahren immer dann vorteilhaft, wenn das Enzym teuer ist und die Stabilität deutlich verbessert werden kann.

Ein großer Vorteil einer Autoanalyzereinheit ist seine Flexibilität. Bei der Produktion anderer Stoffe kann ohne Schwierigkeit, bei Beibehaltung des apparativen Aufbaus, auf die entsprechende Nachweisreaktion umgestellt werden. Durch Änderung der Volumenströme kann der Meßbereich der Produktkonzentration in weitem Umfang angepaßt werden. Bei der Bestimmung von Glucose-6-phosphat ist der Nachweis mit Glucose-6-P-Dehydrogenase auf eine einfache Weise möglich. Die Produktkonzentration ist allerdings für eine direkte Messung zu hoch und muß daher in einem vorgeschalteten Durchlauf mit Puffer verdünnt werden





(Abbildung 16). Bei den in der Abbildung 16 angegebenen Fließraten erlaubt die Linearität des Meßsignals Produktkonzentrationen bis zu 60 mmol/l (siehe Abbildung 17). Durch wiederholtes Messen von Standardlösungen ist auch während des kontinuierlichen Betriebs eine Kontrolle der Analytik durchführbar (vgl. Kapitel 5.2.2). Alle Ströme sind auf ein kleinstmögliches Maß reduziert, um die Verbrauchskosten klein zu halten. Als Enzym wird die Dehydrogenase aus *L. mesenteroides* in Verbindung mit NAD eingesetzt. Der Pufferlösung wird zur einwandfreien Blasenbildung Brij®-35 (Polyoxyethylenlaurylether) als Netzmittel zugesetzt. Die genaue Zusammensetzung der einzelnen Ströme ist im Anhang A.5 vermerkt.

5.6.2 DATENVERARBEITUNG

Die rechnergestützte Datenverarbeitung dient im vorliegenden Fall ausschließlich zur flexiblen Verarbeitung der während der Betriebszeit anfallenden großen Datenmengen. Die Extinktion des Photometers ist die einzige ausgewertete Größe. Die Programme sind in drei aufeinanderfolgenden Stufen gegliedert:

Datenaufnahme: Beim Datenerfassungsprogramm 'DIGIDAT' handelt es sich um die einzige kontinuierlich die Versuchszeit andauernde Routine. Es übernimmt in vorgegebenen Zeitabständen Daten am Schreiber Ausgang des Photometer und normalisiert sie. Als Ergebnis werden Wertepaare aus Versuchszeit und Extinktion in Datensätzen bestimmter Länge ausgegeben. Um Änderungen innerhalb von Minuten korrekt zu verfolgen, wurden Aufzeichnungsraten von weniger als 1 Minute (meist 45 sec) vorgegeben. Solche Änderungen werden beim Einspritzen von Standardlösungen zur Überprüfung des Analysesystems wichtig und dürfen zur richtigen Auswertung nicht verloren gehen. Das in Fortran geschriebene Programm enthält eine Reihe seitens der Herstellerfirma zur Verfügung gestellter Unterprogramme zur Ablaufsteuerung (Timing) und Lesen der BCD-Schnittstelle.

Datenreduktion: Die von 'DIGIDAT' erstellten Dateien enthalten aufgrund der hohen Aufnahmezeit eine Fülle von Werten, die bei nur geringen Schwankungen einen geringen Informationsgehalt aufweisen. Außerdem würde unnötig viel Speicherplatz verbraucht und eine lange Laufzeit nachfolgender Auswerteprogramme verursacht werden. Daher wurde ein in Pascal formulierter Reduktionsalgorithmus vorgesehen, der versucht, eine laufende Reihe von Meßwerten durch eine lineare Funktion zu approximieren. Der von dem Geradenstück überstrichene Bereich wird solange durch einen zusätzlichen Meßpunkt erweitert, wie die Abweichung für einen der enthaltenen Werte ein bestimmtes relatives oder absolutes Fehlerkriterium nicht verletzt. Im Ergebnis ist die Wertemenge auf die Eckpunkte von Geradenstücken reduziert. Die Dichte der übernommenen Daten verhält sich proportional zu ihrer Änderungsgeschwindigkeit. Das Programmmodul 'REDUDAT' wurde nur nachträglich ('Off-line') verwendet. Besteht die Möglichkeit zur Kopplung von Fortran- oder Macro-Assembler-Routinen, kann die Datenreduktion mit der Datenerfassung integriert werden ('On-line'). Die Dateien konnten durchschnittlich auf 5% des ursprünglichen Umfangs reduziert werden.

Datenbewertung: Die in den reduzierten Dateien vorliegenden Extinktionswerte müssen nun zu den gewünschten Konzentrationen umgerechnet werden. Dabei sind die besonderen Eigenschaften der Analyse durch Korrekturmaßnahmen zu berücksichtigen. Verschleiß von Pumpschläuchen oder Störungen durch Verschmutzung der Durchflußküvette

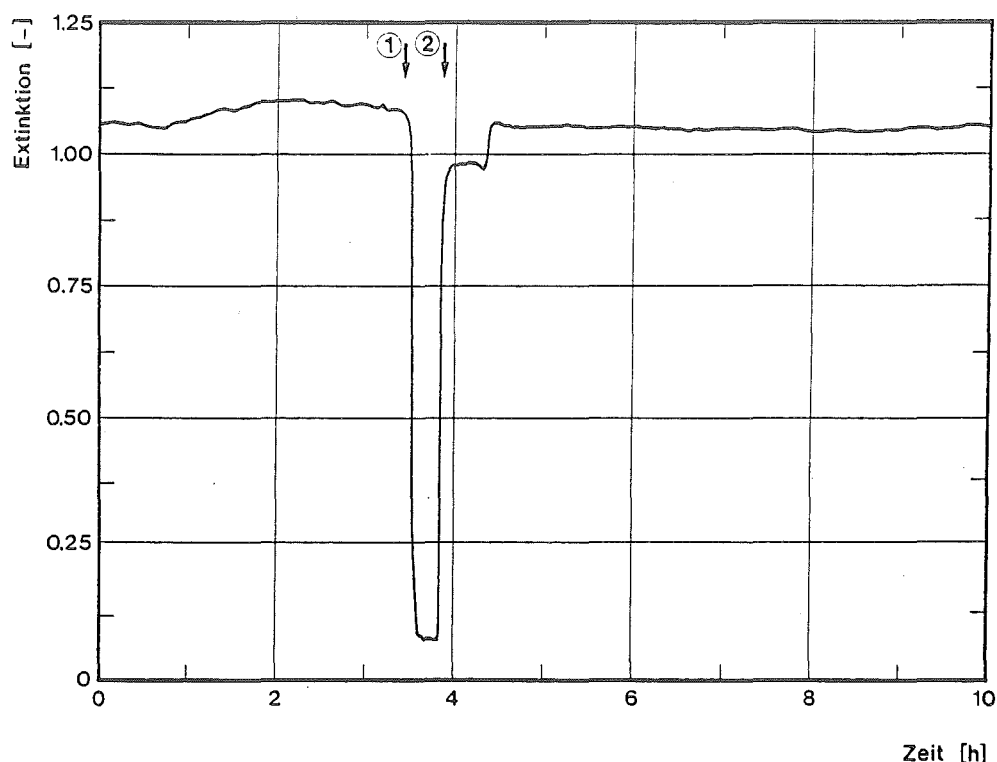


Abbildung 18. Ausschnitt aus dem Extinktionsverlauf des Autoanalyzers
 1.Marke: Nullwert, 2.Marke: Standard (50 mmol/l)

sind Ursachen, die sich erst innerhalb von Tagen bemerkbar machen, aber nicht vernachlässigt werden dürfen.

Die innerhalb der Meßdaten vorliegenden Werte für die Standardmessungen sind leicht an den sprunghaften Änderungen zu erkennen (Abbildung 18). Mit ihnen liegt im Abstand von ca. 12 Stunden Information über Nullpunkt und einen Standardwert in der Größenordnung der Reaktorkonzentration vor. Bei der verwendeten Einstellung der Pumpenströme betrug die Standardkonzentration 50 mmol/l. Die erkennbare Drift von 0-Punkt und Abweichung der Steigung werden von dem Pascalmodul 'KORRDAT' zur Korrektur der gemessenen Reaktorkonzentration verwendet. Zu jedem einzelnen Extinktionswert werden 0-Punkt und Steigung durch lineare Interpolation neu berechnet und die Konzentration durch einfache Vergleichsrechnung mit der Extinktion des Standards ermittelt und ausgegeben.

6.1 ALLGEMEINE EIGENSCHAFTEN UND BISHERIGE ERFAHRUNGEN

Um beim Betrieb eines Enzymmembranreaktors Coenzyme verwenden zu können, müssen sie so modifiziert werden, daß ihre Größe auf ein den Enzymen vergleichbares Maß angehoben wird. Durch Bindung an ein wasserlösliches Polymer erhält man eine Art 'molekulargewichtsvergrößerter' ATP, das die sichere Abtrennung von Produkten mit einer Ultrafiltrationsmembran erlaubt.

Erfahrungen mit der Verknüpfung von Cofaktoren und polymeren Verbindungen gibt es beispielsweise aus der Herstellung von Material zur Affinitätschromatographie /53,69-72/. Als lösliches Makromolekül bieten sich Polyacrylderivate /54,73-75/, Dextran /49/, Polyethylenglycol (PEG) /76,77/, Polyethylenimin (PEI) /51/, Polylysin /51/ oder globuläre Proteine an. In einem weiteren Vorschlag wird Coenzym an das Enzymprotein selbst kovalent gebunden /78/.

Für das optimale Polymer lassen sich folgende Eigenschaften angeben:

- Es gewährleistet eine ausreichende Retention.
- Das Polymer verhält sich neutral. Es ist mit der Reaktorlösung verträglich und hat selbst keinen nachteiligen Einfluß auf die enzymatische Reaktion.
- Es führt zu keinen wesentlichen verfahrenstechnischen Nachteilen. Dies betrifft in erster Linie die Erhöhung der Viskosität.
- Es erlaubt hohe Coenzymkonzentrationen im Reaktor.
- Die Kopplung zwischen Polymer und Coenzym ist unproblematisch und bleibt stabil.
- Das gebundene Coenzym kann effektiv genutzt werden.
- Die Synthese bleibt auch im größeren Maßstab unproblematisch.

Es ist bekannt, daß die Coenzyme ihre Aktivität nur behalten, wenn sie in einiger Entfernung vom Polymer gebunden sind. Durch ein eingesetztes Zwischenstück - den sogenannten Spacer - kann die sterische Hinderung durch das Makromolekül kleingehalten und ein ausreichender Kontakt zwischen Enzym und Coenzym gewährleistet werden. Zum polymergebundenen Coenzym führen drei prinzipielle Wege. Entweder wird ein Derivat des

Nucleotids, bestehend aus Nucleotid und Spacer, synthetisiert und mit einem Polymer verknüpft, oder der Spacer ist zuerst am Polymer gebunden. Der dritte Weg führt über eine Copolymerisation von derivatisiertem Nucleotid und geeigneten Comonomeren.

Der Spacer muß an einer Position angebracht sein, die die Coenzymaktivität nach Möglichkeit wenig beeinflusst. Bei den Adeninnucleotid-Coenzymen haben sich unter anderem durch Studien an Enzym-Coenzym-Komplexen die N⁶-Aminogruppe sowie die C⁸-Position als geeignete Angriffspunkte zur Derivatisierung herausgestellt /79/. Andere Bindungen, beispielsweise an der Ribose, sind ausschließlich für unlösliche Derivate zur Affinitätschromatographie von Interesse /53/.

Bei der Überprüfung von polymergebundenen ATP-Derivaten hat sich eine außerordentlich hohe Abhängigkeit der coenzymatischen Aktivität von der Struktur des eingesetzten Spacers ergeben. Solche Einflüsse sind auch von NAD(H)-Derivaten bekannt /11,80/, allerdings sind die Änderungen gegenüber dem nativen Coenzym nicht so extrem. Der bisher einzige Versuch, anhand von vergleichenden Enzymtests Einflüsse von Polymer und Spacer systematisch zu untersuchen, wurde mit 18 verschiedenen Polyacryl-ATP-Derivaten von Yamazaki *et al.* durchgeführt /54/. In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen auf die Michaelis-Menten-Konstante und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei einer Reihe von Kinasen getestet. Demnach sind hydrophile Spacer und hydrophile, positiv geladene Polymere mit niedrigem Molekulargewicht und niedriger ATP-Dichte anderen Derivaten vorzuziehen. Solche globalen Aussagen treffen allerdings bei einzelnen Enzymen nicht immer zu.

Abgesehen von möglichen sterischen Schwierigkeiten am aktiven Zentrum, die auch mit Spacern nicht zu beheben sind, reagiert offensichtlich der spezifische Mechanismus ATP abhängiger Enzyme sehr empfindlich auf die Eingriffe am Molekül. In diesem Zusammenhang sei an die Funktion des Magnesiumkomplexes (Abbildung 7 auf Seite 27) erinnert, an dem der Adeninteil beteiligt ist. Genaue Untersuchungen an Enzym-Metall-Substrat-Komplexen an einigen Phosphotransferasen sind bei Mildvan /64/ angegeben. Die Tatsache, daß die Aktivität NAD(H) verwendender Enzyme zwar auch beeinflusst wird, aber bislang immer erhalten blieb, kann als ein weiterer Hinweis gedeutet werden, wenn man den Adenosinteil des NAD als ein Art 'nativen' Spacer auffaßt, der den aktiven Nicotinsäureamidrest vom künstlichen Spacer und dem Polymer trennt.

In der Tabelle 6 sind die zur Verfügung stehenden Derivate mit den bislang in der Literatur beschriebenen polymergebundenen ATP-Derivaten zusammengestellt. Auch wenn die Werte der kinetischen Konstanten mit einigem Vorbehalt zu behandeln sind, weil die Angaben für das native Coenzym zum Teil erheblich differieren, werden die möglichen Differenzen deutlich. Die Dextranderivate zeigen gegenüber den Polyacryl- und PEG-Verbindungen durchweg erhöhte Michaelis-Menten-Konstanten. Bei

	Nukleotidgehalt [μmol/g]	Aktivität K_m [mmol/l] V_{max} [%nativ]					
	(enzymatisch)	Acetat-Kinase		Hexokinase		Glycerokinase	
		K_m	V_{max}	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}
nat.		1.24	100	0.53	100	0.09	100
a	27.1	1.67	35	0.38	35	0.49	92
b	85.4	3.32	15	0.44	15	0.62	58
c	15.5	4.00	29	0.28	29	0.17	70
d	509	--	--	0.2	66	0.29	42
e	136	0.014	20	0.025	100	--	--
f	53.6	1.00	41	0.093	144	--	81
g	96.6	--	0	--	31	--	--

Dextran-

- a -N⁶(N-(3-aminopropyl)carbamoylethyl)thiomethyl-ATP
b -N⁶,N⁶-bis(N-(3-aminopropyl)carbamoylethyl)thiomethyl-ATP
c -N⁶-(N-(6-aminohexyl)carbamoyl)-ATP /49,72/

Polyacryl-

- d 18 verschiedene ATP-Derivate /54/*
e -N⁶-aminoalkyl Derivate /73/

PEG-

- f 5 verschiedene ATP-Derivate (siehe Kapitel 5.2)*

PEI-

- g -N⁶-ATP (siehe Kapitel 5.2)

Tabelle 6. Vergleich von polymergebundenen ATP-Derivaten

(* - In der Tabelle sind die erreichten Bestwerte aufgeführt)

einer Reihe der aufgeführten Polymer-ATP wurde zusätzlich die Aktivität von Pyruvat-Kinase und 3-Phosphoglycerat-Kinase überprüft. Hier gab kein einziges Derivat eine nachweisbare Reaktion.

6.2 CHARAKTERISIERUNG DER VERWENDETEN ATP-DERIVATE

Da die Aktivität von polymergebundenem ATP sowohl stark von seiner Struktur als auch vom in Betracht genommenen Enzym abhängt und kaum vorhersehbar ist, wird es notwendig, an interessierenden Enzymen eine Reihe unterschiedlicher ATP-Derivate zu erproben.

Ausgehend von den Erfahrungen der Verknüpfung von Polyethylenglycol mit NAD(H), für das einfache Methoden der Substituierung erarbeitet wurden /76,77/, wurden eine Reihe neuer ATP-Derivate synthetisiert.² Sie erfüllen die oben genannten Anforderungen in hinreichender Weise. Im Vergleich mit den übrigen in der Tabelle 6 aufgeführten Polymer-ATP-Derivaten zeigen sie meist bessere enzymatische Eigenschaften.

Es wurden 5 verschiedene PEG-gebundene ATP und ein PEI-Derivat synthetisiert. Die Synthesewege und ihre Struktur sind in den folgenden Abbildungen skizziert. Sowohl das PEG als auch das ATP werden modifiziert und mit Carbodiimid gekoppelt. Ein Weg führt über die Kopplung von Amino-hexyl-ATP und einer Carboxyl- (PEG-ATP I und II) oder einer Thiocyanatfunktion (PEG-ATP III). Der vollständige Spacer ergibt sich dadurch erst beim Zusammenfügen. Bei den anderen Synthesen wird Methylsulfonyl-ATP verwendet. Die Kopplungen erfolgen unter Abgang des Methylsulfonylrestes mit einer Aminogruppe des PEI (PEI-ATP VI) oder des entsprechend präparierten PEG (PEG-ATP II', IV und V). Ein Spacer wird bei der Polymerderivatisierung berücksichtigt. Da die Funktionalisierung des Polymers ausschließlich endständig erfolgt, werden bei vollständigem Umsatz genau zwei Mol ATP pro Mol Polymer gebunden. Dies bedeutet für kürzere Moleküle einen höheren gewichtsbezogenen ATP-Gehalt. Die gemessenen Werte zeigten allerdings starke Schwankungen von Charge zu Charge. In der Tabelle 7 sind die Gehalte als Summe von ATP und ADP angegeben.

Die Verbindungen PEG-ATP II und II' unterscheiden sich lediglich durch ihren Syntheseweg. Das Molekulargewicht der Ausgangspolymere betrug nominell 20000 (PEG-ATP I, II' und III) und 40000 (PEG-ATP IV, V und PEI-ATP VI). Von PEG-ATP II wurden sowohl Chargen mit 20000 und mit 40000 hergestellt. Bei Verwendung einer Membran mit einer Ausschußgrenze von 5000 Dalton konnten für beide Polymergrößen ausreichende Retentionswerte gemessen werden. Die photometrisch (260 nm) gemessenen Extinktionen für ausgespültes ATP während der kontinuierlichen Versuche lagen unter 0.002, dies entspricht einer Retention >0.994.

² Die polymergebundenen ATP-Derivate wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Morr, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig-Stöckheim, zur Verfügung gestellt.

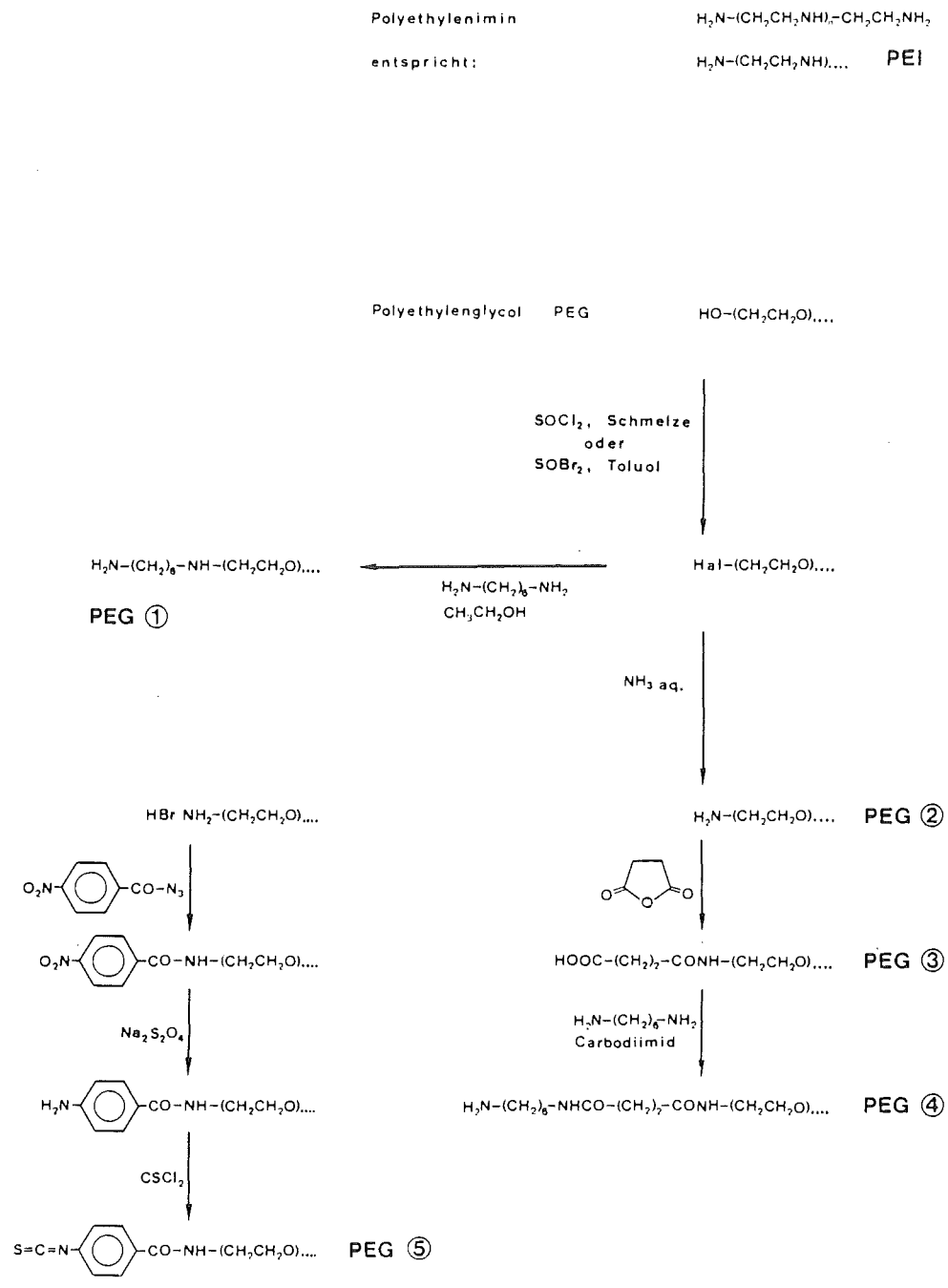
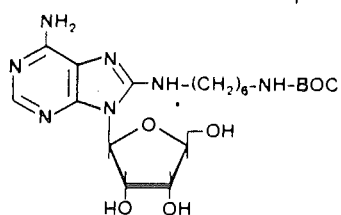
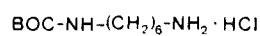
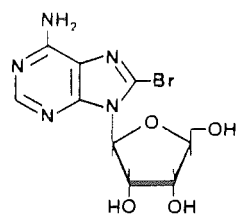
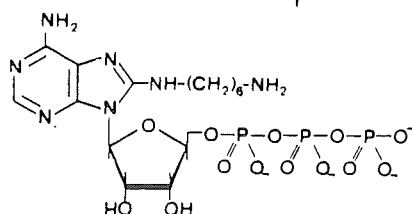


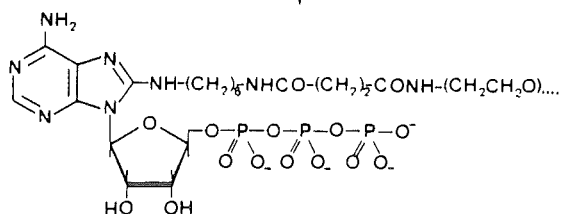
Abbildung 19. Derivatisierung der Polymere (nach Morr /81/)



1. POCl₃
2. Na₄P₂O₇
3. BOC-Abspaltung

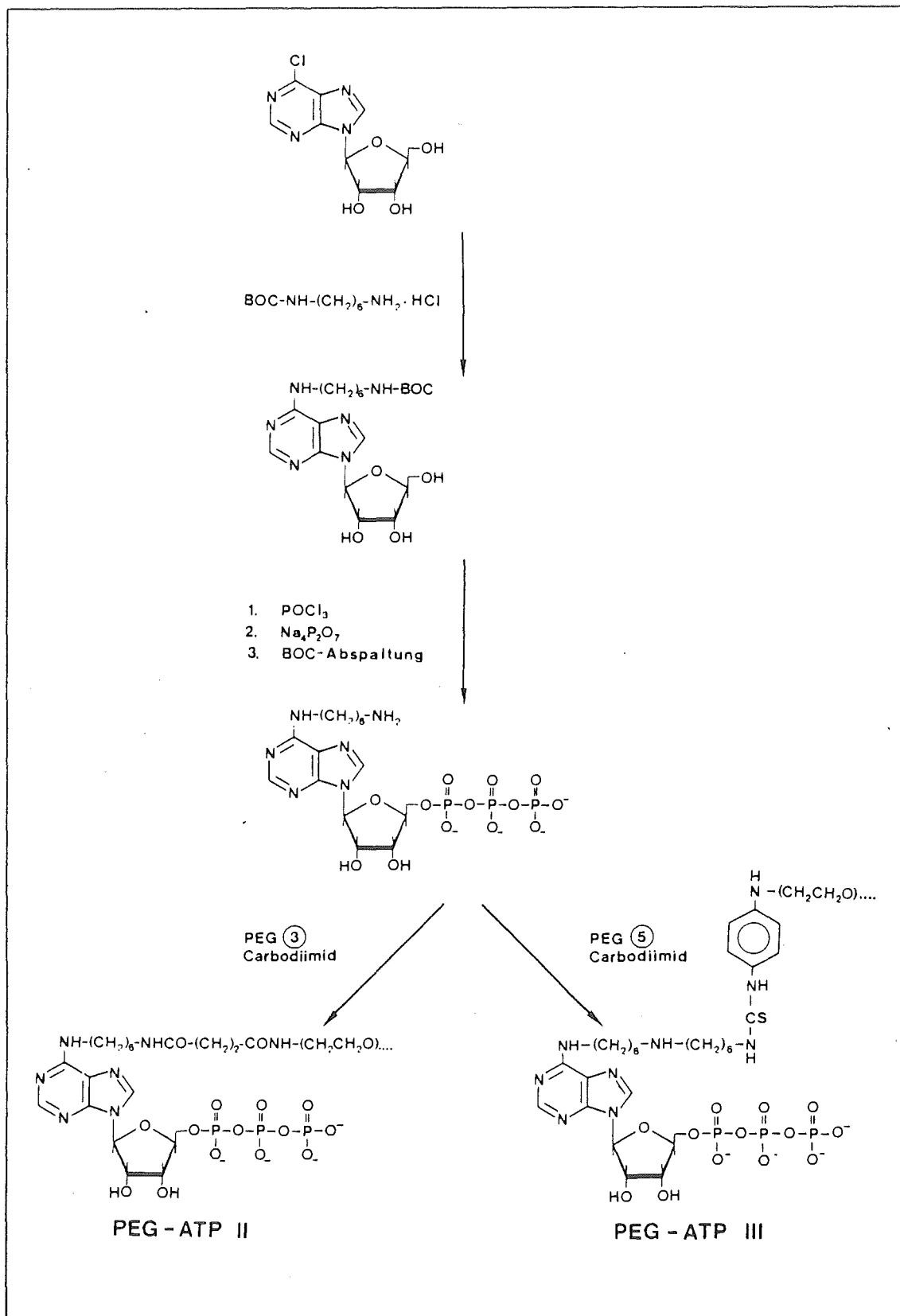


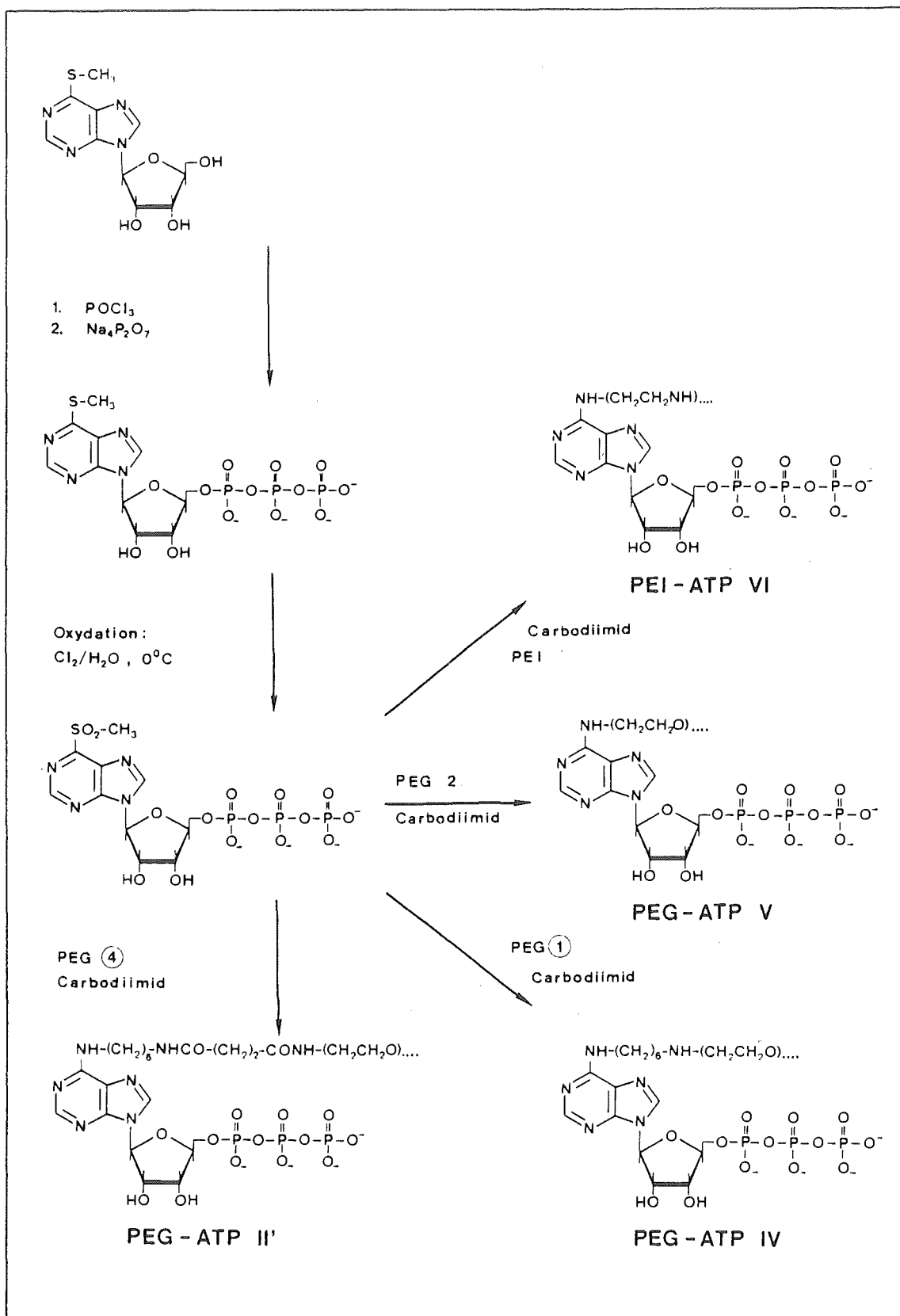
PEG (3)
Carbodiimid



PEG - ATP I

Abbildung 20. Synthese und Struktur der untersuchten Polymer-ATP
Derivate : (nach Morr /81/)





ATP-Gehalte (mol/mol)		
Derivat	Molekulargewicht	
	20000 *	40000
PEG-ATP I	1.21	--
PEG-ATP II	1.33	0.96
PEG-ATP II'	1.61	--
PEG-ATP III	0.50	--
PEG-ATP IV	--	1.43
PEG-ATP V	--	1.79
PEI-ATP VI	--	1.93

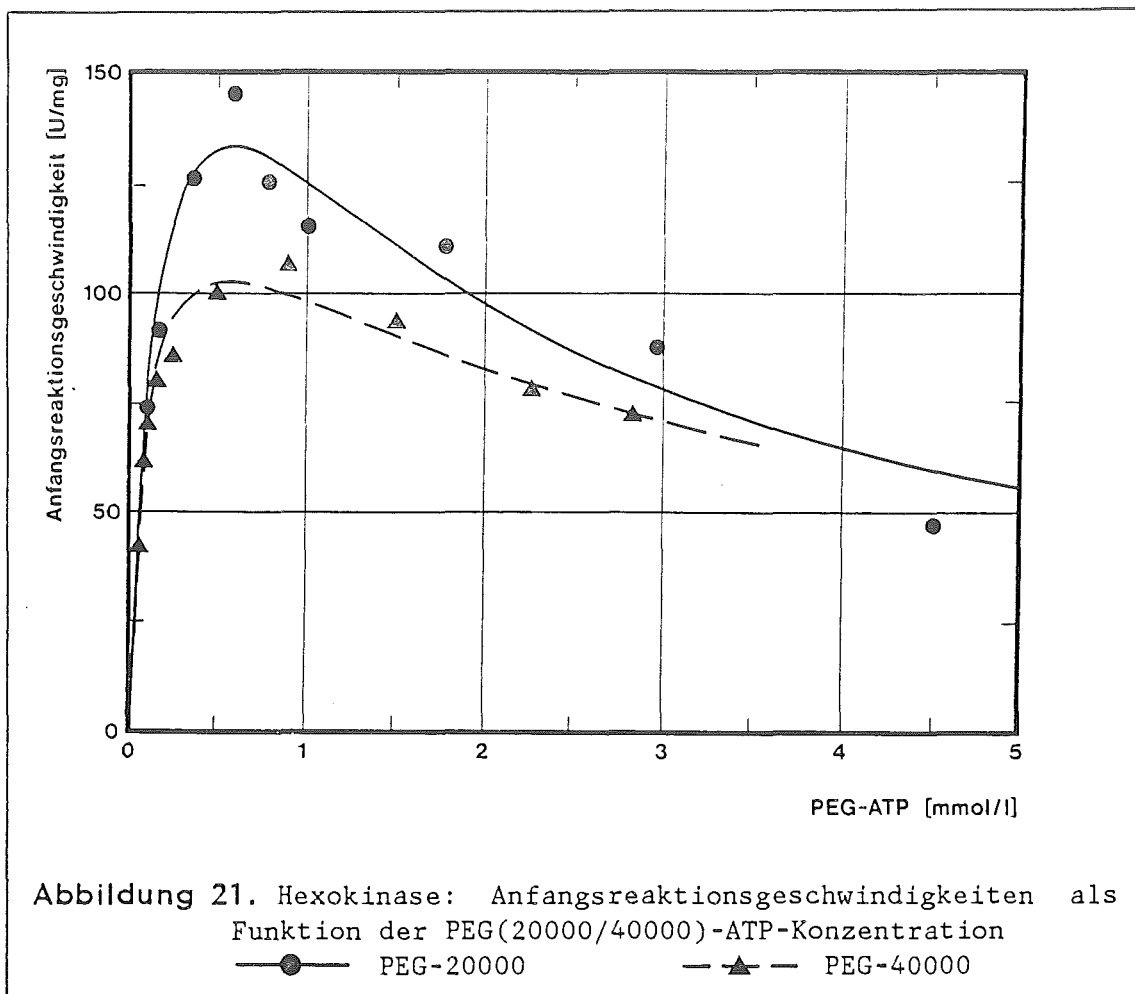
Tabelle 7: ATP-Gehalt der untersuchten Derivate

(* - die Angaben beziehen sich auf gemessene 30000)

(maximale mögliche Bindung: 2 [mol(ATP)/mol(Polymer)])

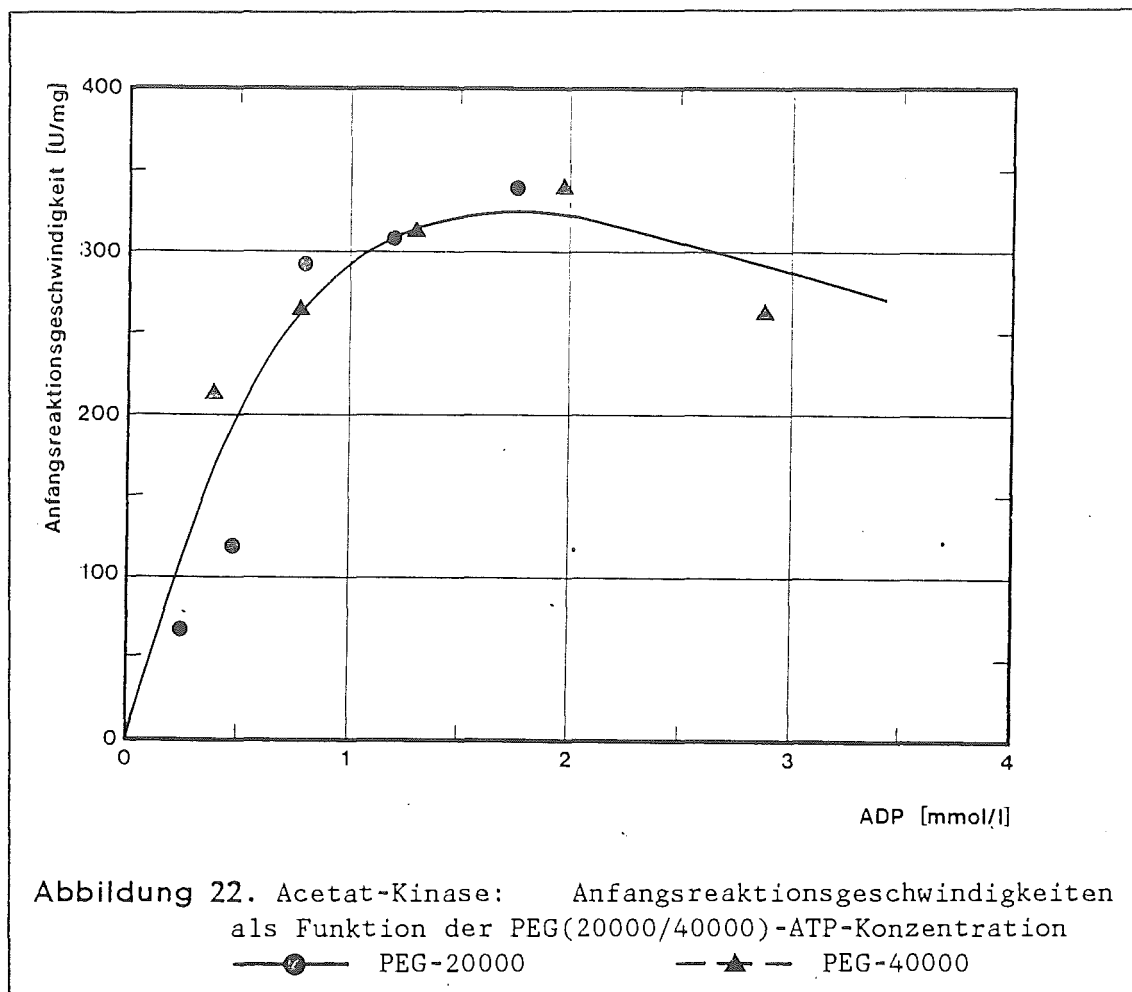
Es ist anzumerken, daß gelchromatographische Messungen der PEG-20000 Charge ein mittleres Molekulargewicht von 30000 ergaben, PEG-40000 wurde nicht überprüft /82/.

Bei hohen ATP-Konzentrationen macht sich allerdings die Zähigkeit der Lösung unangenehm bemerkbar. Mit einem ATP-Gehalt von 4 mmol/l werden mit Glycerin vergleichbare Viskositäten (> 100 cP) erreicht. Da die Viskosität ungefähr proportional zur Polymerkonzentration (g/l) ist und jedes Molekül zwei Bindungsorte für ATP besitzt, senkt die Verwendung kleinerer Molekulargewichte die Viskosität der Reaktorlösung oder erlaubt höhere ATP-Konzentrationen. Messungen von Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten zeigen eine mögliche Abhängigkeit der maximalen Reaktionsrate von der Polymergröße bei Hexokinase (Abbildung 21), während Messungen mit Acetat-Kinase nur geringe Abhängigkeit der kinetischen Parameter vom Molekulargewicht erkennen lassen (Abbildung 22). Jedoch ist ein solcher Vergleich mit dem Vorbehalt zu versehen, daß sich Unterschiede dieser Art und Größenordnung bei ATP-Chargen des gleichen Derivats beobachten lassen. Eine der möglichen Ursachen ist ein unterschiedlicher Gehalt an AMP. Die Spaltung von ATP zu ADP und AMP wurde bei der Kopplung mit wasserlöslichem Carbodiimid beobachtet /81/. Darüber hinaus ist ein Abbau des enzymatisch aktiven ATP bei Lagerung im Kühlschrank (6°C) meßbar (> 0.2 mmol/g Monat). Der Vergleich mit dem photometrisch meßbaren



Adenosingehalt ergibt dabei einen steigenden AMP-Anteil. Da AMP nicht wie ADP enzymatisch zu ATP phosphoryliert werden kann, ist im Einzelfall eine scheinbare Änderung der Kinetik meßbar. Hier mag auch ein Ansatz zur Erklärung der unterschiedlichen coenzymatischen Aktivität der Derivate II und II' liegen.

Die wohl wichtigste zu überprüfende Eigenschaft der Derivate bleibt die der ausreichenden coenzymatischen Aktivität. Zu diesem Zweck wurden eine Anzahl von käuflich erhältlichen Phosphotransferasen mit den vorhandenen Polymer-ATP-Chargen getestet. Die verwendeten Nachweise sind in Kapitel 5.1. 'Aktivitätsbestimmung ausgewählter Enzyme' und dem dazugehörigen Anhang A.1 beschrieben. Die Auswahl wurde unter dem Gesichtspunkt einer möglichen Anwendbarkeit getroffen. Dies betrifft sowohl Enzyme, die sich zur ATP-Regenerierung eignen (vgl. Tabelle 3 auf Seite 20) als auch solche mit einer nutzbaren Reaktion. Im Rahmen der Arbeiten von Denda und Kiesling, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig-Stöckheim, wurden die Enzyme der Glutathionsynthese sowie Polyphosphat-Kinase überprüft. Die Untersuchung soll nicht



nur ein weiteres Gütemerkmal für ein polymergebundenes ATP ergeben, sondern auch gleichzeitig klären, ob ein bestimmtes Enzym überhaupt ein derivatisiertes Coenzym akzeptiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengestellt. Die Reaktionsgeschwindigkeiten wurden bei Polymer-ATP-Konzentrationen von 0.5, 1.0 und 1.5 mmol/l gemessen und auf die mit nativem ATP erreichbare maximale Reaktionsrate bezogen.

Es ist bemerkenswert, daß es zu Acetat-Kinase als regenerierendes Enzym offenbar keine Alternative gibt. Pyruvat-, Kreatin- und Carbat-Kinase zeigen bei keinem Derivat Aktivität. Die fehlende Aktivität der Adenylatkinase schließt darüberhinaus eine Regenerierung von AMP vorerst aus. Gleichzeitig wird deutlich, daß das PEG-ATP II als einziges Derivat zusammen mit Acetat-Kinase für eine Regenerierung ausreichend wirksam ist. Auch die anderen Enzyme zeigen in der Regel mit PEG-ATP II höhere Reaktionsraten als bei anderen Derivaten.

Die Überprüfung von NAD-Kinase, Hexokinase, Glycerokinase und γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase ergab für eine Produktion ausreichende Aktivi-

Enzyme zur ATP-Regenerierung							
	ATP-Derivat						
Enzym	I	II	II'	III	IV	V	VI
Pyruvat-Kinase	0	0	0	0	0	0	0
Acetat-Kinase	--	73	73	--	16	0	0
Carbamat-Kinase	0	0	0	0	0	0	0
Creatin-Kinase	0	0	0	--	0	0	0
Adenylat-Kinase	0	0	0	--	0	0	0
Polyphosphat-Kinase	--	10	--	--	--	--	--

Enzyme zur Produktion							
	ATP-Derivat						
Enzym	I	II	II'	III	IV	V	VI
Hexokinase	--	144	100	32	97	49	31
Gluconat-Kinase	0	0	0	0	0	0	0
NAD-Kinase	--	80	14	--	160	56	12
Glycerokinase	--	81	70	--	46	50	--
3-Phosphoglycerat-Kin.	0	0	0	0	0	0	0
Nucleosidmonophosphat-K.	--	0	--	--	--	--	--
Nucleosiddiphosphat-K.	--	0	--	--	--	--	--
γ-Glutamyl-Cystein-Synt.	--	80	--	--	--	--	--
Glutathion-Synthetase	--	0	--	--	--	--	--

Tabelle 8. Relative Enzymaktivität mit Polymer-ATP
(Aktivität mit nativem Coenzym =100%)

tät. Mit letzterem kann zwar das Dipeptid erzeugt werden, der Folgeschritt zum Tripeptid Glutathion erwies sich dagegen als vorerst nicht durchführbar. Überraschend ist die in einigen Fällen erreichbare Reaktionsgeschwindigkeit mit bis zu 60% höheren Werten als die maximale Geschwindigkeit beim nativen Coenzym. Bei allen Enzymen wurden die höchsten Raten bei 0.5 und 1.0 mmol/l Polymer-ATP gemessen. Genaue kinetische Untersuchungen wurden mit Acetat-Kinase und Hexokinase durchgeführt und sind im anschließenden Kapitel 7.1 dargestellt.

7.0 DAS SYSTEM ACETAT-KINASE / HEXOKINASE

ATP-Verbrauch und -Regenerierung können nur dann sinnvoll gekoppelt werden, wenn die kinetischen Eigenschaften der Enzyme ausreichend bekannt sind. Neben den Abhängigkeiten von Substrat- und Produktkonzentrationen ist der Einfluß von Effektoren und den Randbedingungen Temperatur und pH zu überprüfen. Dabei müssen sowohl Reaktionsgeschwindigkeit der Enzyme und die Stabilität von Enzym, Coenzym und Reaktanden in Betracht gezogen werden. Ihre Kenntnis liefert die Voraussetzung zur Beschreibung des Zeitverlaufes und der Prozeßoptimierung bei der Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen. Auf die Bedeutung für die Auslegung eines geeigneten Reaktors wurde bereits im Kapitel 3.3 hingewiesen.

Im folgenden Abschnitt sollen die bestimmenden Einflußgrößen beim System Acetat-Kinase / Hexokinase untersucht werden. Zur Identifizierung von Parametern in den verwendeten Gleichungen wurden Optimierungsverfahren benutzt. Als zu minimierende Zielfunktion galt im Sinne der Methode der kleinsten Quadrate die Quadratsumme der Differenzen von Meßwert und dem Ergebnis der Modellrechnung. Aus der Fülle von Optimierungsverfahren erschien zum einen die von Nelder und Mead modifizierte Simplexmethode und zum anderen die von Schwefel vorgestellte Evolutionsstrategie /83/ als geeignet. Sie zeichnen sich durch ihren einfachen, sich den Gegebenheiten der Zielfunktion anpassenden Algorithmus und ihrer Konvergenzsicherheit ohne Verwendung von Ableitungen erster oder zweiter Ordnung aus. Zur Simplexmethode wurde eine Modifikation des von Bajpai /84/ angegebenen Fortranprogramms benutzt. Zur Evolutionsstrategie fand eine verbesserte, in Pascal geschriebene Programmfassung Verwendung. Beide Routinen wurden unabhängig von einander eingesetzt, in der Regel wurde bei komplexeren Aufgaben der Evolutionsstrategie der Vorzug gegeben.

Aus dem vorigen Kapitel geht hervor, daß die Ergebnisse mit den vorliegenden ATP-Derivaten keine andere Wahl als Acetat-Kinase zur Regenerierung lassen. Die anderen im Abschnitt 2.3 besprochenen Kriterien treten dabei in den Hintergrund, auch wenn sie ebenfalls Acetat-Kinase als geeignet erscheinen lassen.

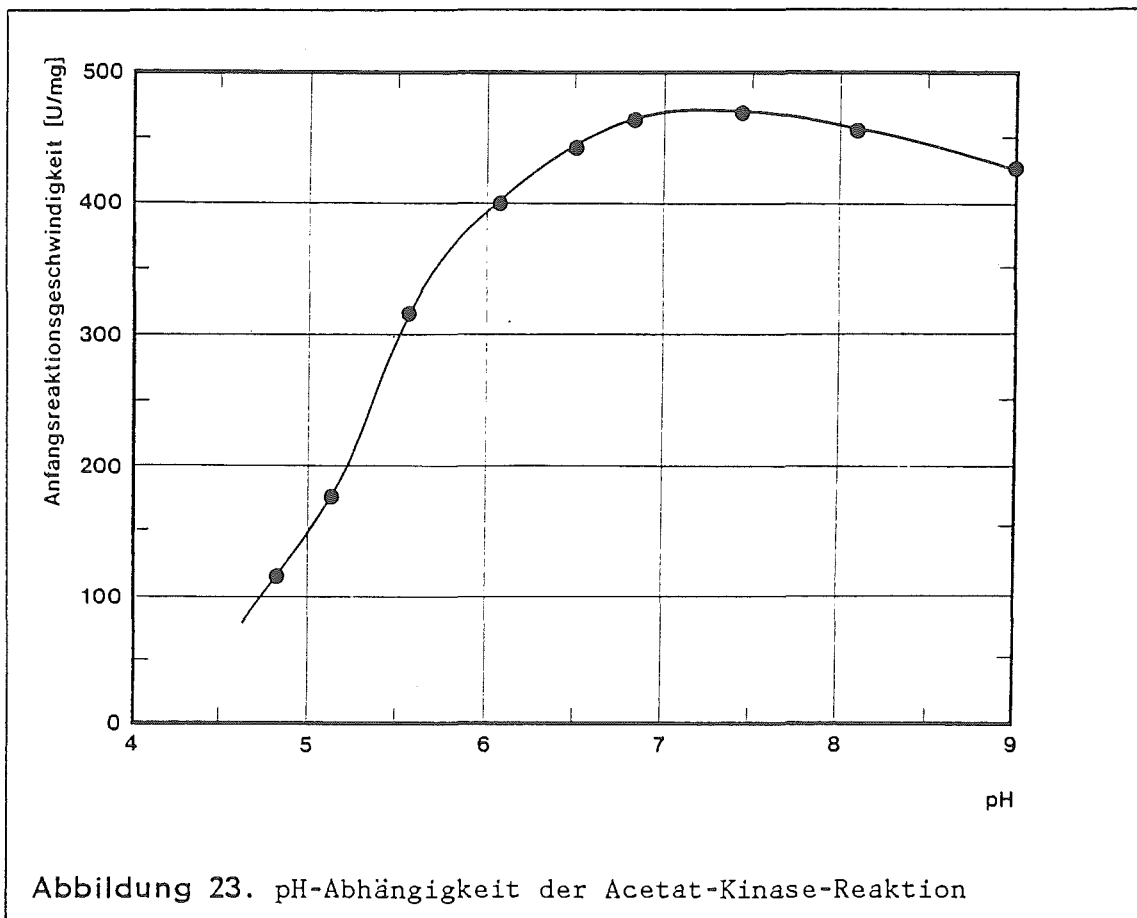
Auf der ATP verbrauchenden Seite wurde für kontinuierliche Produktionsversuche mit Hexokinase ein Enzym ausgewählt, daß nicht nur zusammen mit Polymer-ATP eine herausragende Reaktionsgeschwindigkeit bietet, sondern auch leicht erhältlich und ein bereits gut untersuchtes Enzym ist. Zur Messung seiner Aktivität stehen erprobte Verfahren zur Verfügung.

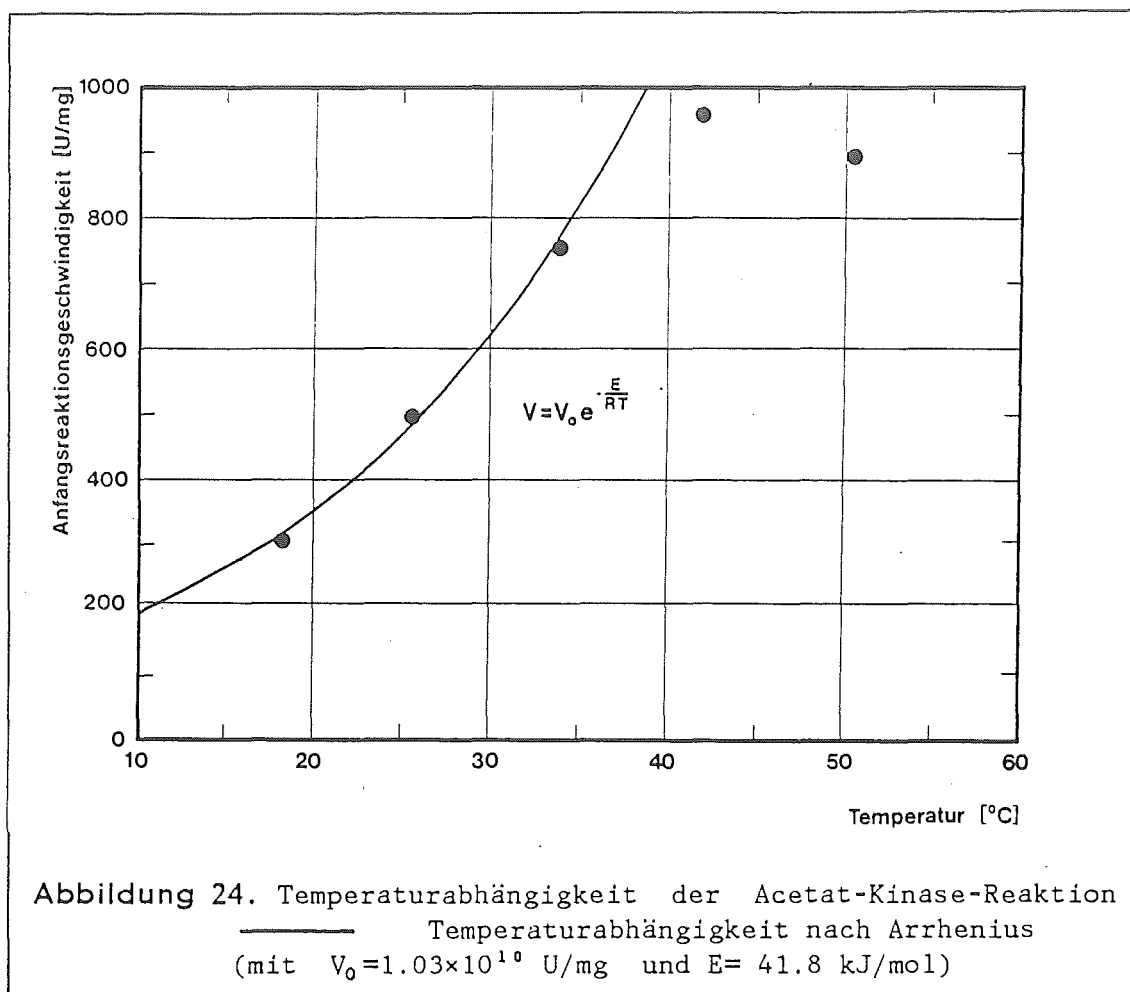
7.1 KINETISCHE UNTERSUCHUNG

7.1.1 KINETISCHE MESSUNGEN MIT ACETAT-KINASE

Die im folgenden beschriebenen Messungen wurden mit dem aus *E. coli* gewonnenen Enzym durchgeführt. Es stand in hochreiner Form zur Verfügung. Vergleiche mit bislang in der Literatur beschriebenen Studien über Acetat-Kinase /68,85-88/ sind gut möglich, da meistens das gleiche Präparat verwendet wurde. Ziel dieser Studien ist die Klärung des Enzymmechanismus, sie können daher eine spätere Modellbildung unterstützen. Soweit möglich, d.h. solange Kontrollversuche mit PEG-ADP keine signifikante Abweichungen ergaben, sind die folgenden Messungen mit nativen Coenzym durchgeführt worden.

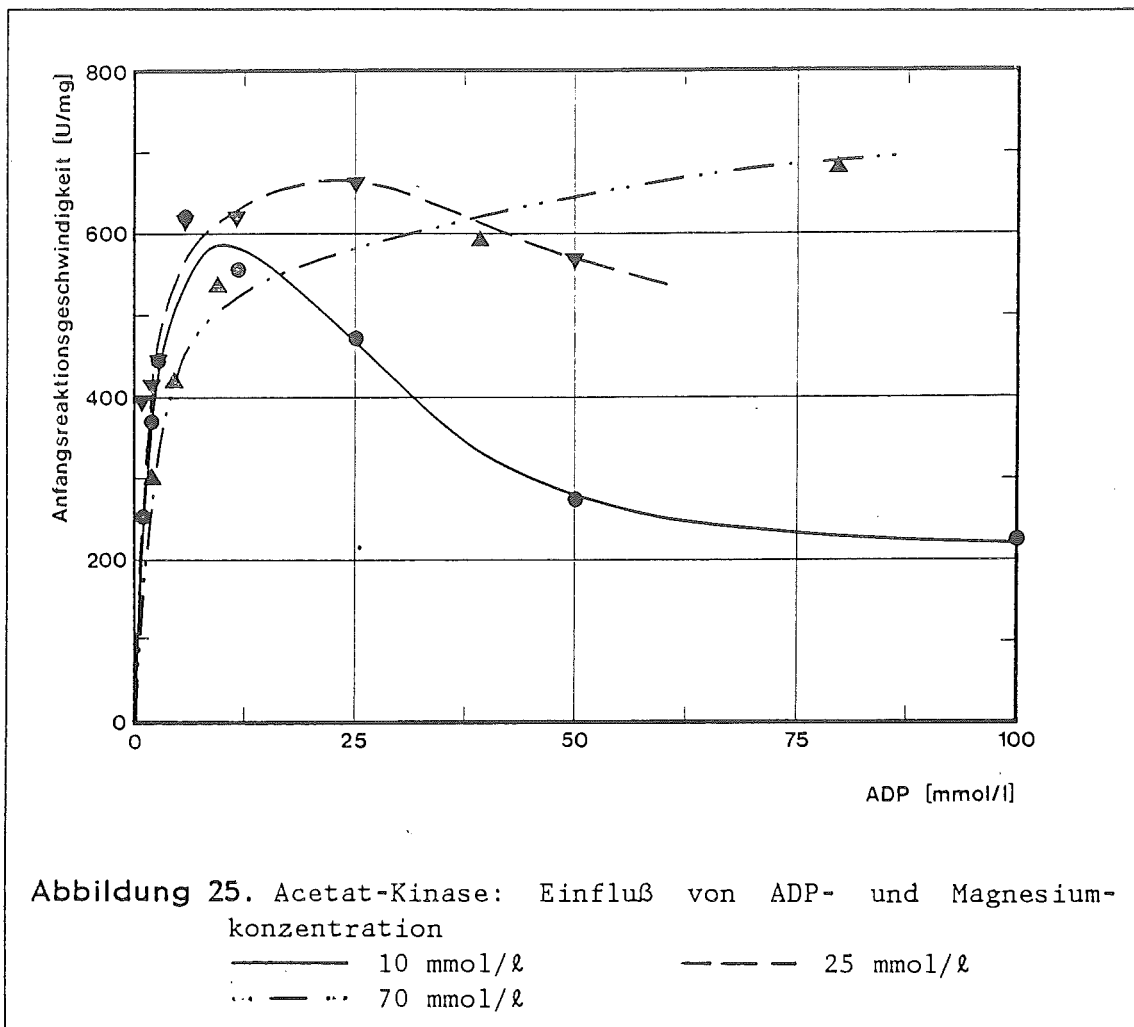
Die von anderen Autoren angegebenen Werte für den optimalen pH-Bereich weichen stark voneinander ab. Wie die in Abbildung 23 dargestellten Messungen zeigen, besitzt Acetat-Kinase ein breites pH-Profil mit einem





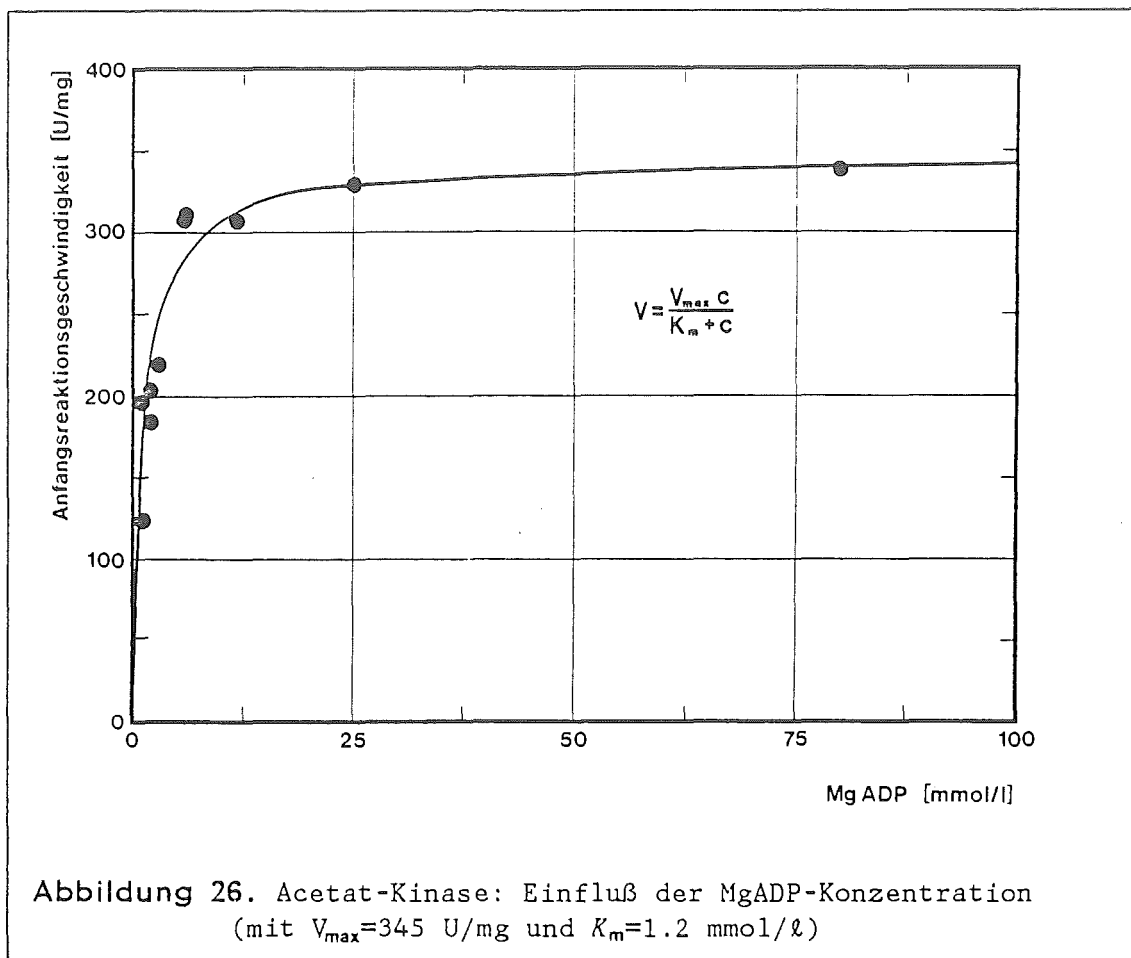
Optimum um pH 7.6. Unterhalb von pH 6 nimmt die Aktivität schnell ab, während im oberen Bereich bis pH 9 nur eine geringe Abnahme zu verzeichnen ist. Das pH-Optimum bleibt innerhalb der angegebenen Werte unabhängig von Temperatur und Konzentrationen der Reaktanden /68/. Unterhalb von pH 5 wird das Enzym bei Raumtemperatur irreversibel geschädigt.

Die Temperaturabhängigkeit der Reaktion (Abbildung 24) ergibt ein Optimum bei 45°C. Der untere Temperaturbereich läßt sich bis ca. 33°C durch einen Ansatz nach Arrhenius beschreiben. Bei höheren Temperaturen macht sich der wachsende Einfluß der thermischen Enzymdesaktivierung bemerkbar. Die berechnete Aktivierungsenergie beträgt 41.8 kJ/mol.



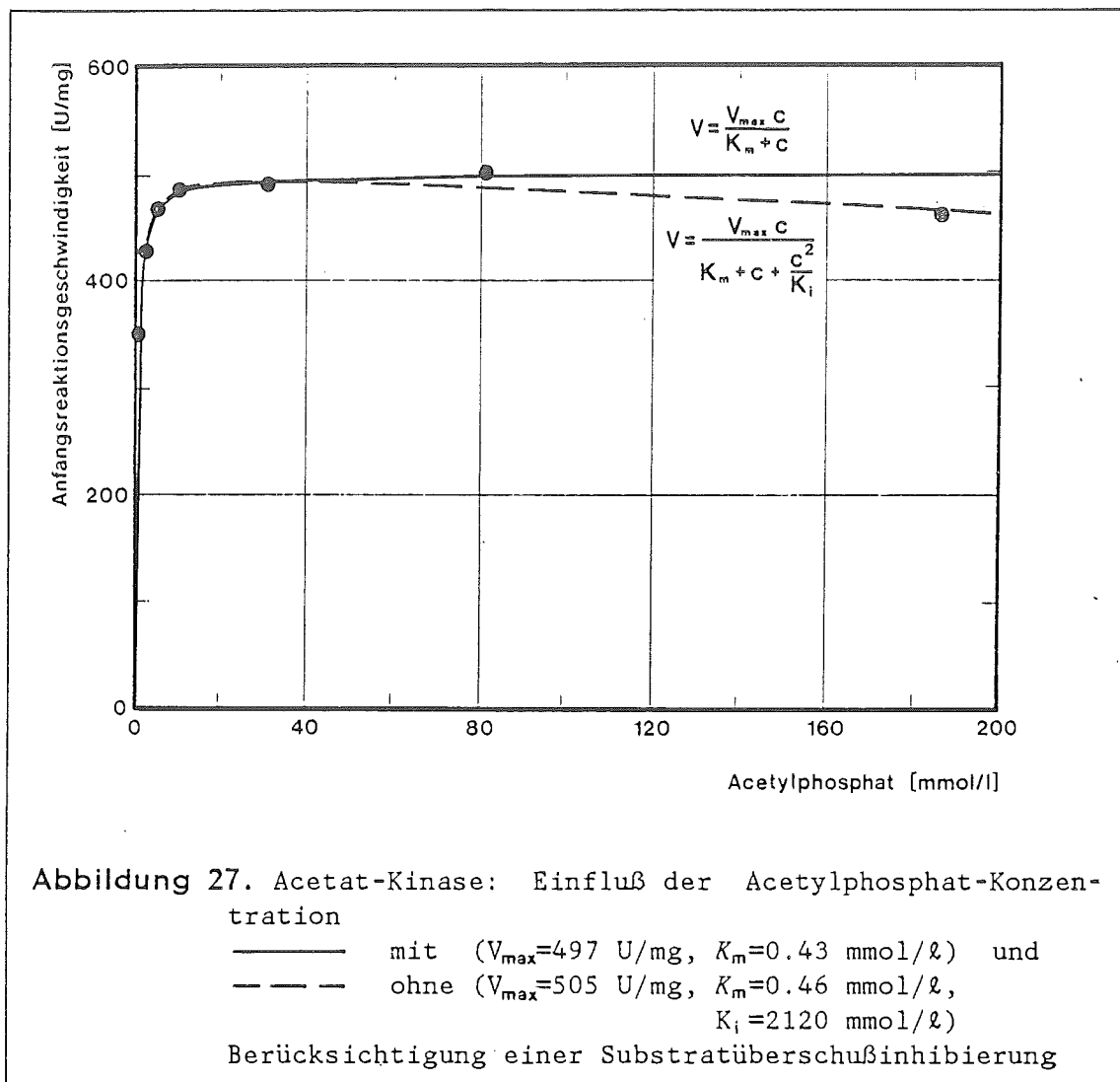
Kinetische Messungen mit dem Substrat ADP zeigen die erwartete Abhängigkeit von der vorhandenen Magnesiumkonzentration. Abbildung 25 zeigt, wie sich das Verhältnis von ADP und Magnesium auf die Anfangsreaktionsraten auswirkt. Mit konstanter Magnesium- und steigender ADP-Konzentration erreicht die Reaktionsgeschwindigkeit ein Maximum; höhere ADP-Werte bewirken eine Hemmung. Hohe Magnesiumwerte führen nicht zu einer Aktivierung, sondern ebenfalls zu einer schwachen Inhibierung.

Diese Phänomene sind allgemein bei Phosphotransferasen zu beobachten. Der Grund wurde bereits bei den theoretischen Erläuterungen (Kapitel 3.2) erwähnt. Die eigentliche aktive Verbindung ist der Komplex von Magnesium und ADP. Das Enzym bindet daneben sowohl freies Magnesium als auch unkomplexiertes ADP. Damit erklärt sich, warum die maximale Enzymaktivität nur bei ungefähr gleichen Konzentrationen erreicht werden kann. Liegt einer der Komplexpартner im Überschuß vor, kommt es gegenüber dem Mg-ADP zu einer kompetitiven Inhibierung. Aus der Abbildung

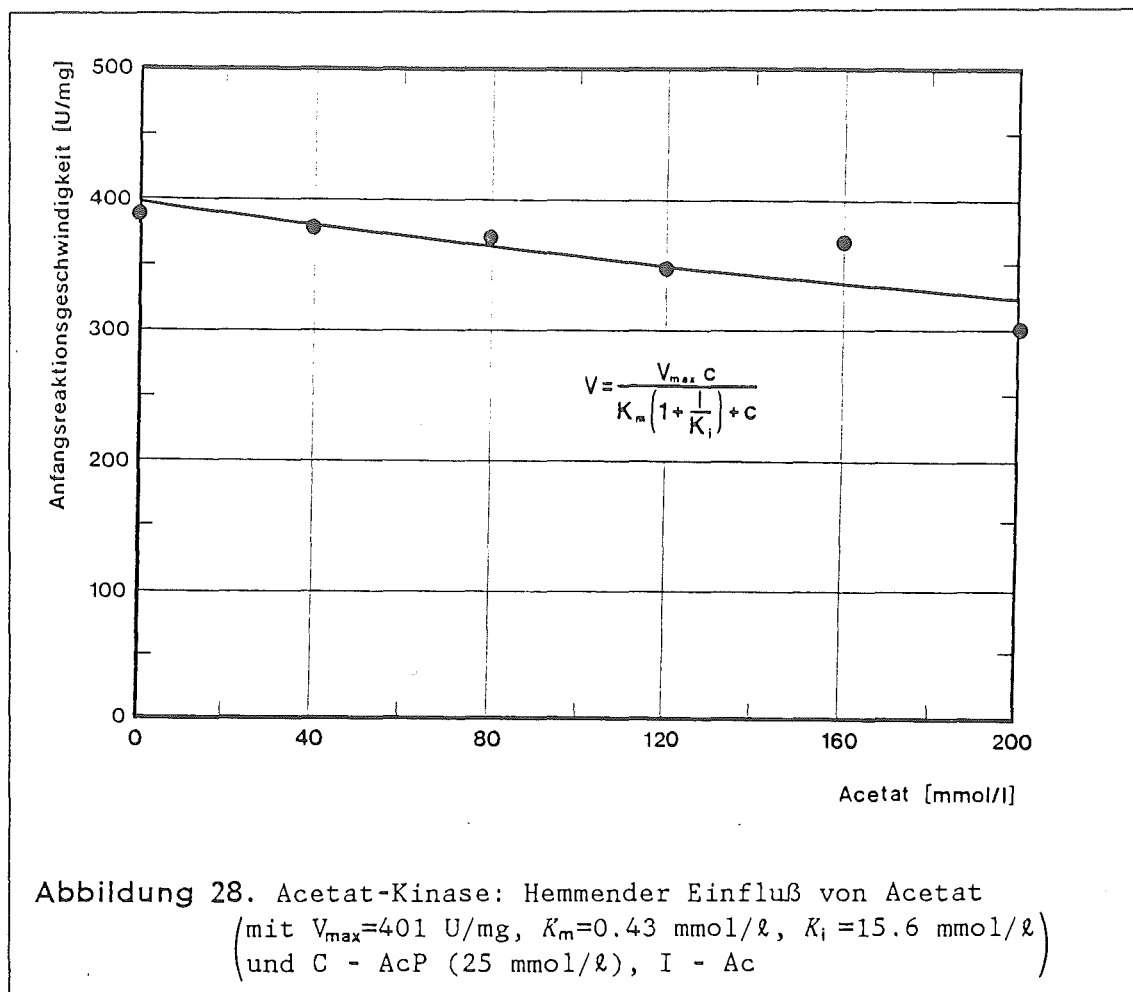


geht hervor, daß die maximale Reaktionsrate mit einigen mmol/l Überschuß an Magnesium gegenüber der ADP-Konzentration erzielt werden kann. Die Magnesiumkonzentration stellt dabei einen Kompromiß zwischen möglichst vollständiger Überführung des ADP in den Mg-ADP-Komplex und der spürbar werdenden Inhibierung durch freie Magnesiumionen dar. Trägt man die Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion der MgADP- anstelle der Gesamt-ADP-Konzentration ab, ergibt sich eine einfache Michaelis-Menten-Kinetik mit einem K_m von 1.2 mmol/l (Abbildung 26). Meßpunkte mit einer merklichen Inhibierung durch freies Mg oder ADP wurden von dieser Rechnung ausgeschlossen.

Die Abbildung 27 zeigt die gemessene Anfangsreaktionsgeschwindigkeit als Funktion der Konzentration des zweiten Substrats Acetylphosphat. Eine nichtlineare Regressionsrechnung liefert für Michaelis-Menten-Kinetik eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von nahezu 500 U/mg und einem K_m -Wert von 0.43 mmol/l. Erst bei Substratkonzentrationen von über 100 mmol/l macht sich eine schwache Hemmung bemerkbar. Die nach Gleichung 23 (Substratüberschußinhibierung) berechnete Inhibierungskonstante liegt bei 2000 mmol/l. Dies bedeutet bei 150 mmol/l Acetyl-

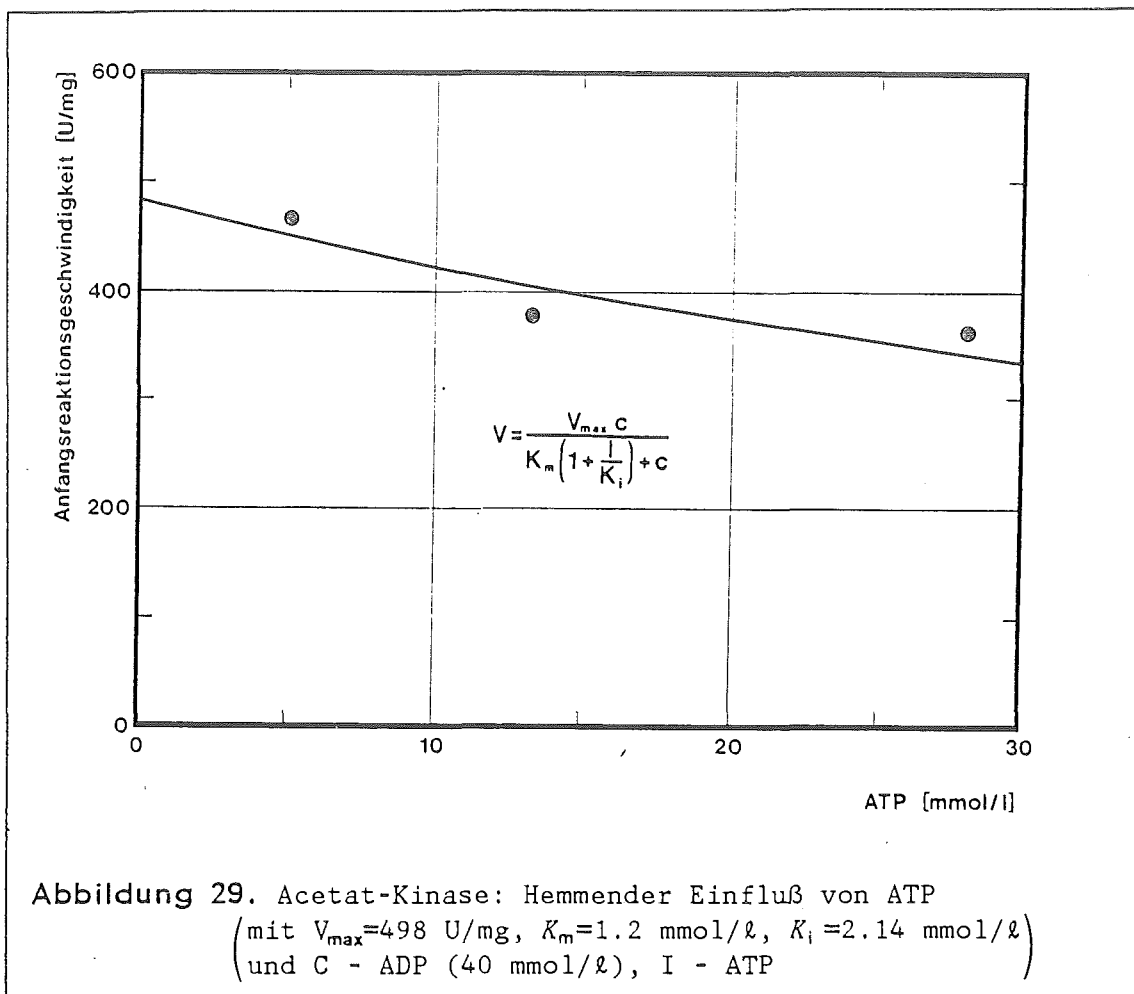


phosphat eine Verringerung der Reaktionsrate um 5%. Ein Einfluß der Magnesiumkonzentration kann als Ursache ausgeschlossen werden, da sie der jeweiligen Acetylphosphatkonzentration angepaßt wurde und sich dadurch die die Reaktion beeinflussenden Mengen freies Magnesium und Mg-ADP-Komplex nur unwesentlich änderten. Die Überprüfung dieser nicht meßbaren Konzentrationen erfolgte rechnerisch aus den zusammengefaßten Bilanzgleichungen der einzelnen Reaktanden und den Gleichgewichtskonstanten der vorhandenen Mg-Komplexe /89/.



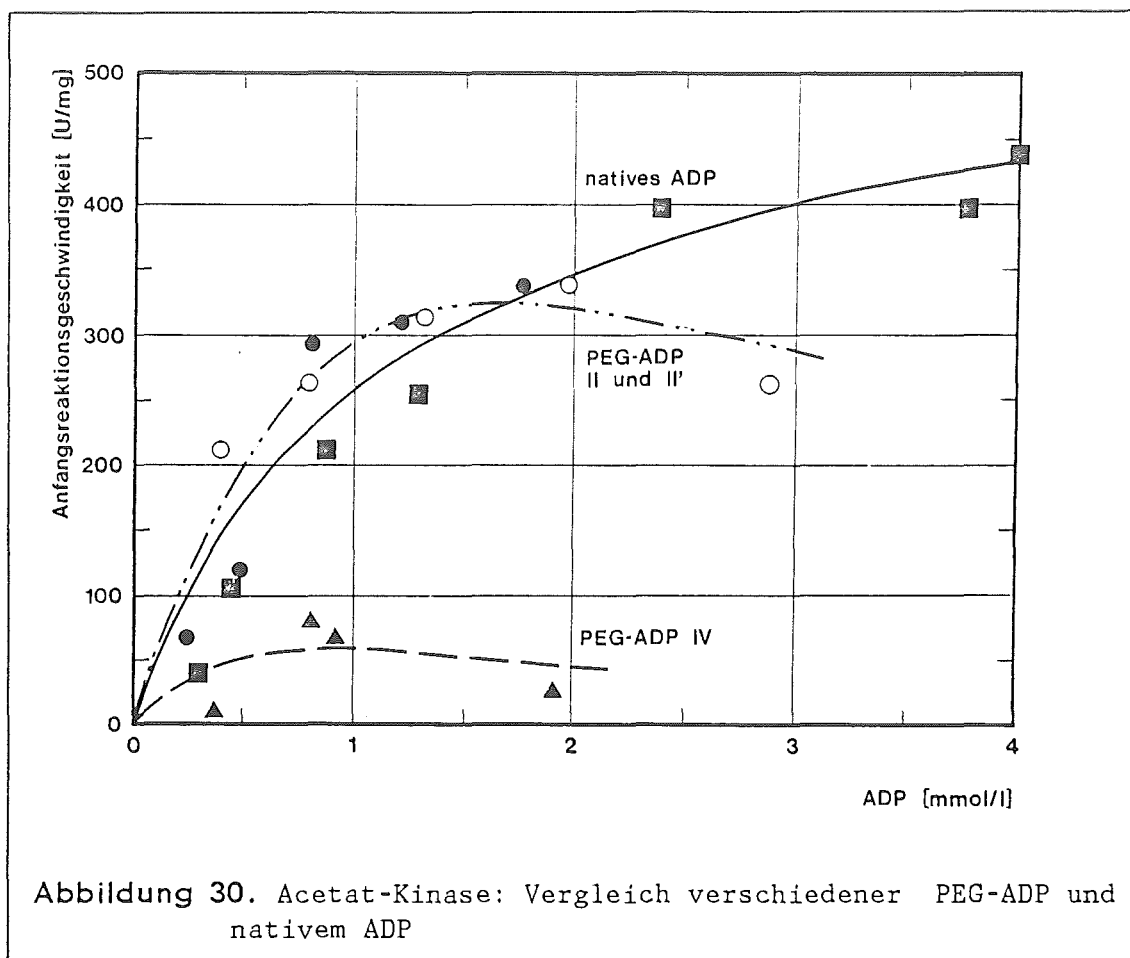
Der nächste Teil der kinetischen Untersuchung gilt den Produkten ATP und Acetat. Da sie im späteren Reaktorbetrieb bei hohen Umsätzen in hoher Konzentration vorliegen, kommt ihrem hemmenden Einfluß bzw. der Rückreaktion große Bedeutung zu. Die Inhibierung der Vorwärtsreaktion wird aus Abbildung 28 für Acetat und aus Abbildung 29 für ATP deutlich. Die dargestellten Daten erlauben noch an sich noch keine Bestimmung des Hemmungsmechanismus (kompetitiv, nichtkompetitiv, etc.). Da bereits umfangreiche Messungen vorliegen /68,87/, wird die Richtigkeit der kinetischen Konstanten bei den vorliegenden Bedingungen überprüft. Die in die Abbildungen eingezeichneten Kurvenzüge geben einen kompetitiven Einfluß von Acetat gegenüber Acetylphosphat und von ATP gegenüber ADP an.

Die bislang beschriebenen Messungen wurden mit nativem Coenzym durchgeführt. Die für den praktischen Einsatz interessierenden kinetischen Daten müssen sich allerdings auf das Polymer-Derivat beziehen. Ein Vergleich der Daten von polymergebundenem und nativem ADP ist unerlässlich.



Durch die begrenzte Löslichkeit des Polymers ist je nach Derivat die erreichbare ADP-Konzentration auf ca. 2.5 bis 4 mmol/l beschränkt.

Abbildung 30 zeigt die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten für die in Tabelle 8 (Seite 66) als coenzymatisch aktiv identifizierten Derivate PEG-ADP II, II' und IV. Wie bereits mit Abbildung 22 dargelegt, läßt sich kein merklicher Unterschied zwischen PEG-ADP II und II' feststellen, für sie wurde eine gemeinsame Ausgleichskurve angepaßt. Während sich die Konzentrationsabhängigkeit für das native Coenzym durch einen Term nach Michealis-Menten beschreiben läßt - es liegt bei allen Versuchen nahezu alles (PEG)-ADP komplexiert vor -, beobachtet man bei allen PEG-ADP ein Maximum. Hohe Konzentrationen zeigen eine deutlich verminderte Reaktionsrate. Ihr Kurvenverlauf ist durch den Einfluß von Substratüberschußinhibierung (Gleichung 23) hinreichend genau beschreibbar. Dies heißt allerdings nicht, daß die Bedeutung der in den Anpassungsrechnungen enthaltenen Parameter auch sinnvoll ist und dem tatsächlichen Mechanismus entspricht.



Für natives ADP: Michaelis-Menten (Gleichung 21)

	V_{\max} [U/mg]	K_m [mmol/l]
nativ	560	1.24

Für PEG-ADP-Derivate: Substratüberschußinhibierung (Gleichung 23)

PEG-ADP	V_{\max} [U/mg]	K_m [mmol/l]	K_i [mmol/l]
II	1410	2.9	1.0
II'	1400	2.9	1.0
IV	300	4.8	0.20

Tabelle 9: Formale Parameter zu den Kurven in Abbildung 30

7.1.2 KINETISCHE MESSUNGEN MIT HEXOKINASE

Der optimale pH-Wert und die Temperaturabhängigkeit wurden nicht neu bestimmt. Verschiedene Autoren geben für das Enzym aus *S. cerevisiae* einen breiten Bereich um pH 8 als optimal an /65,90/.

Hexokinase hat sich als das aktivste von allen getesteten Enzymen herausgestellt. Andere Arbeiten mit ATP-Derivaten bestätigen dies /54/. Die Konzentrationsabhängigkeit der Reaktionsrate ist dabei für die verschiedenen ATP-Derivate sehr unterschiedlich (Abbildung 31).

Auch für Hexokinase ist der Magnesiumkomplex des ATP das eigentliche Substrat. Die Magnesiumkonzentration ist wiederum so eingestellt, daß nahezu die Gesamtmenge ATP als MgATP vorliegt. Wie bereits bei Acetat-Kinase durchlaufen die Kurven ein Maximum. Eine Modellierung durch eine Substratüberschußhemmung vermag auch bei Hexokinase zu einer befriedigenden Beschreibung zu führen.

Für natives ADP: Michaelis-Menten (Gleichung 26)

	V_{\max} [U/mg]	K_m [mmol/l]
nativ	113	0.53

Für PEG-ATP-Derivate: Substratüberschußinhibierung (Gleichung 23)

PEG-ATP	V_{\max} [U/mg]	K_m [mmol/l]	K_i [mmol/l]
I	68	4.9	2.9
II	231	0.21	1.6
II'	154	1.1	1.6
IV	98	0.52	32
V	582	7.8	0.19
VI	54	0.80	0.79

Tabelle 10: Formale Parameter zu den Kurven in Abbildung 31

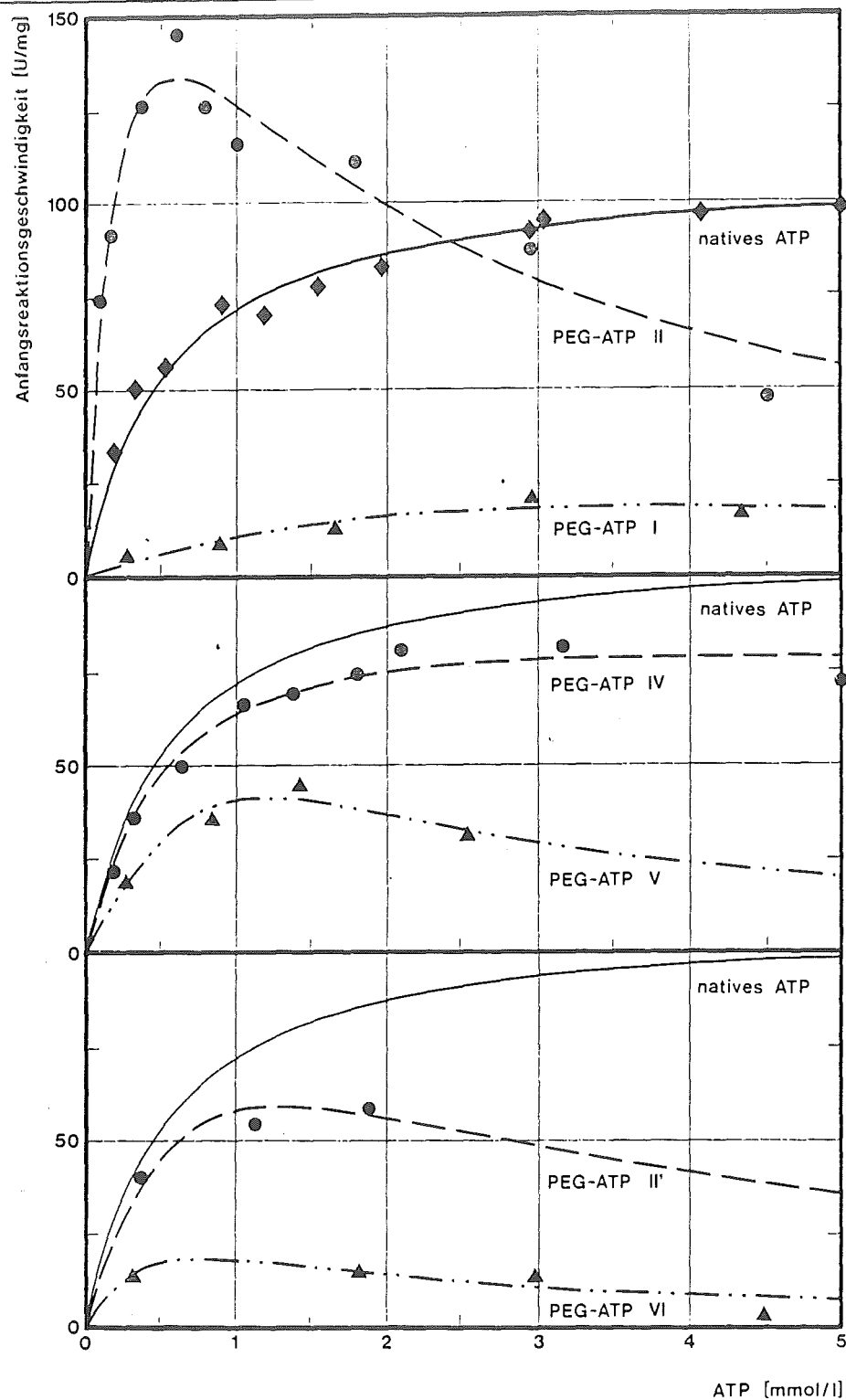
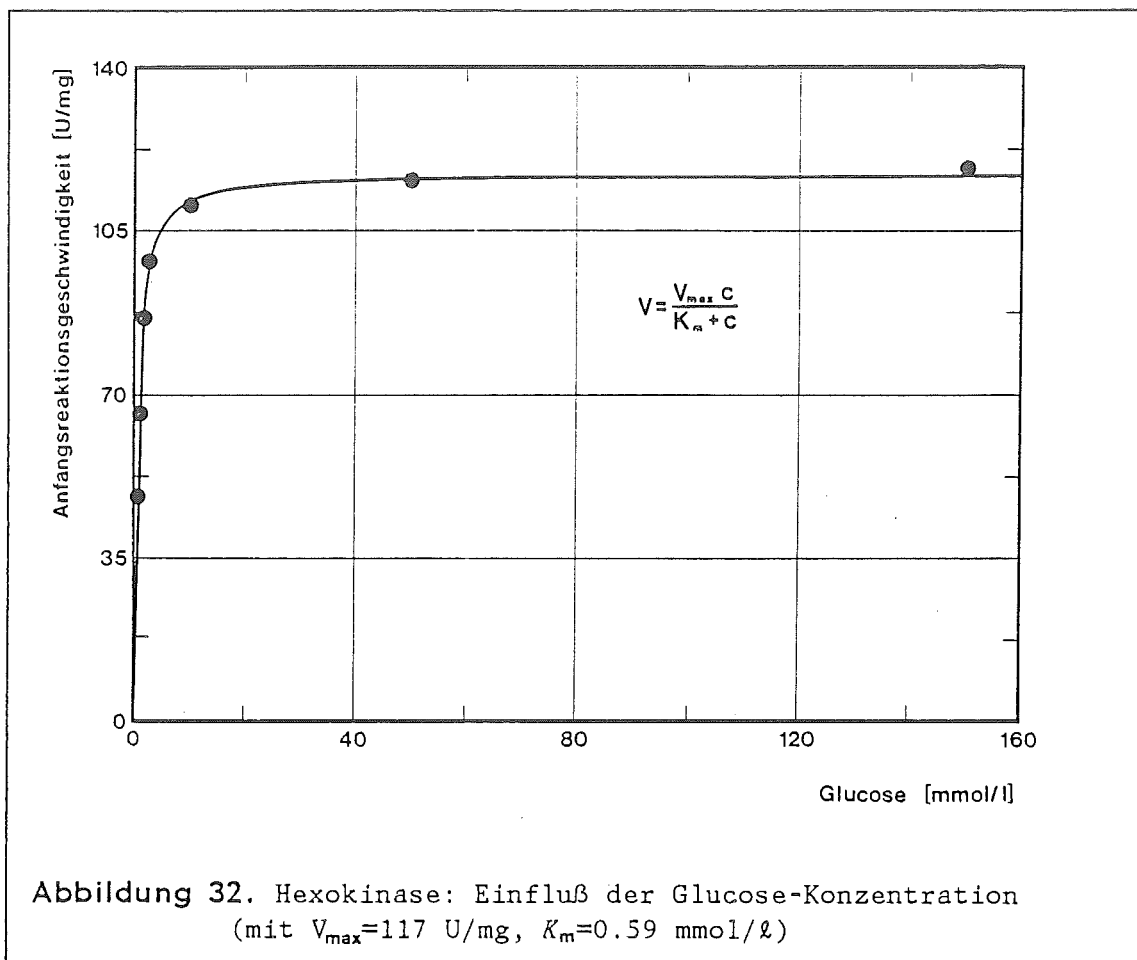
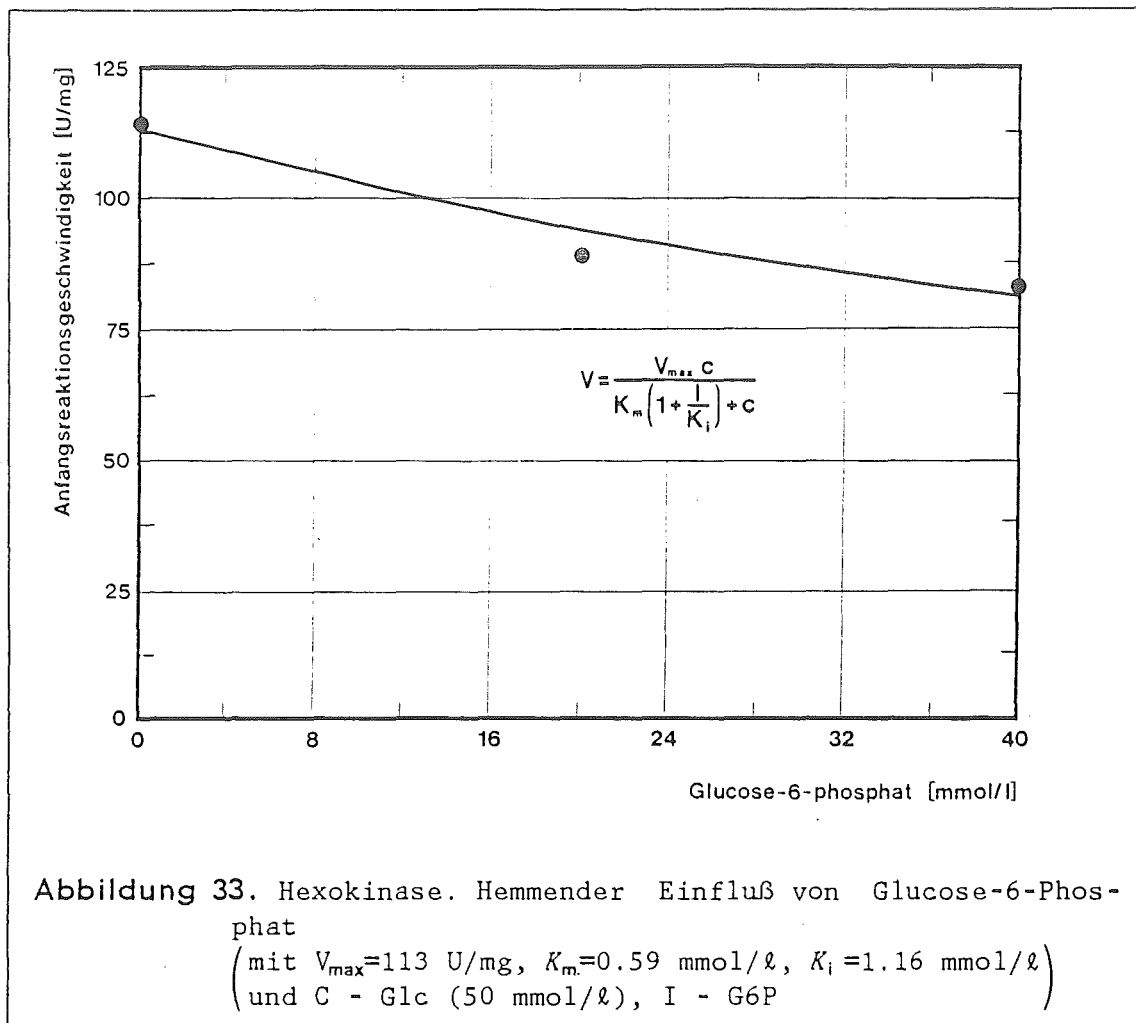


Abbildung 31. Hexokinase: Vergleich verschiedener PEG-ATP und nativem ATP

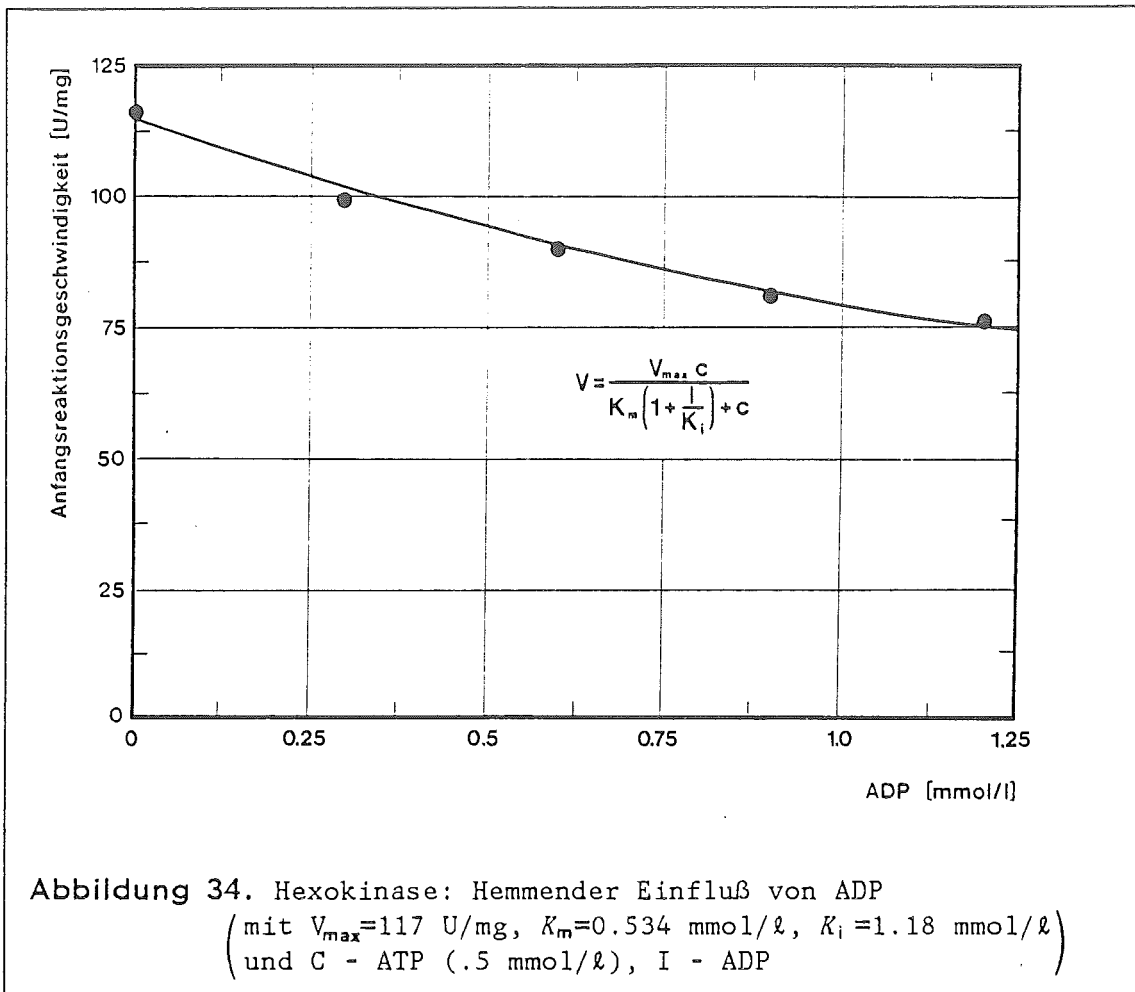


Ein Vergleich der einzelnen ATP-Derivate anhand der gemessenen Aktivitäten, wie er von Yamazaki /54/ durchgeführt wurde, ist nur in begrenztem Umfang möglich, da die am Ende von Abschnitt 6.2 angesprochenen Probleme, wie z.B. unterschiedliche AMP-Gehalte, die durch Spacerstruktur und -eigenschaften verursachten Einflüsse überlagern. Auf entsprechende Spekulationen soll daher verzichtet werden. Trotzdem soll noch die Beobachtung angemerkt sein, daß sich die Reaktionsgeschwindigkeit für natives Coenzym durch zugesetztes Polyethylenglycol nicht merklich herabsetzen läßt.

Hexokinase zeigt bezüglich Glucose eine einfache Michaelis-Menten-Kinetik (Abbildung 32). Die Anpassungsrechnung ergibt einen K_m -Wert von 0.586 mmol/l und eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von 117 U/mg. Diese und die folgende Messung wurden wie bereits bei Acetat-Kinase mit nativem Coenzym durchgeführt.



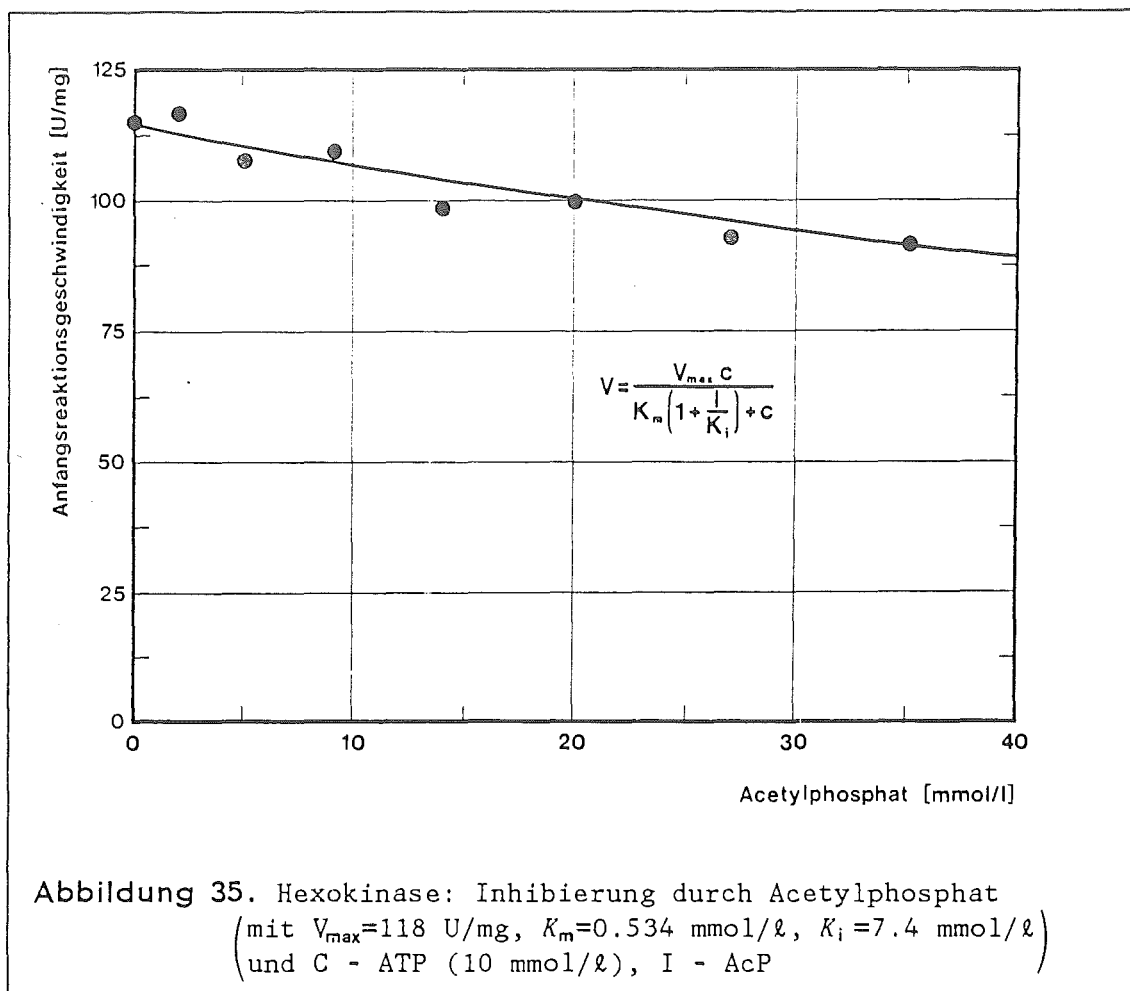
Vorhandenes Produkt bewirkt eine deutliche Inhibierung der Reaktion. Sowohl für ADP als auch für Glucose-6-Phosphat werden kompetitive Inhibierungsmodelle angesetzt /91/. Die aus den Meßpunkten angepaßten Inhibierungskonstanten betragen für ADP 1.18 mmol/l und für Glucose-6-phosphat 1.16 mmol/l (Abbildung 33 und Abbildung 34).



7.1.3 KOPPLUNG DER ENZYME

Aus der Kenntnis der Kinetik der Einzelenzyme lassen sich nun, bevor ein Reaktorversuch durchgeführt wird, Überlegungen zur optimalen Kopplung anstellen. Allerdings müssen zuvor Querbbeeinflussungen durch die für das Einzelenzym noch nicht berücksichtigten und nun zusätzlich in der Reaktorlösung vorkommenden Substrate und Produkte des Partnerenzyms ermittelt und gegebenenfalls in die Kinetik mit eingebunden werden.

Im vorliegenden Fall konnte als einziges bei Hexokinase eine kompetitive Inhibierung von Acetylphosphat gegenüber (PEG)-ATP festgestellt werden (Abbildung 35). Die Anpassungsrechnung ergibt einen K_i -Wert von 7.4 mmol/l Acetylphosphat. Andere Querbbeeinflussungen konnten nicht festgestellt werden.



Zur Zusammenfassung der erhaltenen kinetischen Daten findet bei beiden Enzymen das in Kapitel 3.2 vorgestellte Enzymmodell eines Zweisubstrat-Random-Systems (Gleichungen 14 und 19) Verwendung. Die Gültigkeit des Modells ist in mehreren Arbeiten beschrieben worden /92,93/. Die Gleichung für die Nettoreaktionsgeschwindigkeit ergibt sich durch Hinzufügen der ermittelten Inhibierungsterme aus Gleichung 19 und 20.

Die aus den Messungen zur Verfügung stehenden Parameter sind durch Anpassung an Pseudo-Einsubstratkinetiken, d.h. immer bei Sättigung des zweiten Substrats ($[A] \gg K_{mA}$ bzw. $[B] \gg K_{mB}$) und ohne Einfluß der Rückreaktion ($[Q]=0$ und $[P]=0$), bestimmt worden. Die Michaelis-Menten-Konstanten K_{mA} und K_{mB} sind als einzige direkt aus der Parameteridentifizierung der kinetischen Messungen zu übernehmen. Dagegen sind die übrigen Konstanten erst nach einer Umformung der Gleichungen 37 und 38 in eine Pseudo-Einsubstratkinetik durch den Faktorenvergleich zu erhalten. Fehlende Parameter wie die Gleichgewichtskonstanten wurden der Literatur entnommen /68,91/. Die in den folgenden zwei Tabellen angegebenen

Für Acetat-Kinase gilt:

$$V = \frac{\frac{V_{\max}}{K_{ia}K_{mB}} \left([A][B] - \frac{[P][Q]}{K_{eq}} \right)}{\left(1 + \frac{[A]}{K_{ia}} + \frac{[B]}{K_{ib}} + \frac{[P]}{K_{ip}} + \frac{[Q]}{K_{iq}} + \frac{[A][B]}{K_{ia}K_{mB}} + \frac{[P][Q]}{K_{ip}K_{mQ}} + \frac{[A][P]}{K_{ia}K_{ip}} + \frac{[B][Q]}{K_{ib}K_{iq}} + \frac{[A][A]}{K_{ia}K_{ia}} \right)} \quad (37)$$

Parameter	[mmol/l]	Parameter	[mmol/l]
K_{ia}	0.12	K_{ib}	0.018
K_{ip}	2.6	K_{iq}	0.0088
K_{mB}	0.43	K_{mQ}	7.9
K_{jP}	16.	K_{jQ}	2.4
K_{jA}	0.012	K_{eq}	400 *

Für Hexokinase gilt:

$$V = \frac{\frac{V_{\max}}{K_{ia}K_{mB}} \left([A][B] - \frac{[P][Q]}{K_{eq}} \right)}{\left(1 + \frac{[A]}{K_{ia}} + \frac{[B]}{K_{ib}} + \frac{[P]}{K_{ip}} + \frac{[Q]}{K_{iq}} + \frac{[A][B]}{K_{ia}K_{mB}} + \frac{[P][Q]}{K_{ip}K_{mQ}} + \frac{[A][P]}{K_{ia}K_{ip}} + \frac{[B][Q]}{K_{ib}K_{iq}} + \frac{[A][A]}{K_{ia}K_{jA}} + \frac{[I]}{K_{ij}} + \frac{[B][I]}{K_{ib}K_{ji}} \right)} \quad (38)$$

mit	A	PEG-ATP	P	Glucose-6-phosphat
	B	Glucose	Q	PEG-ADP
	I	Acetylphosphat		

Parameter	[mmol/l]
K_{ia}	2.1
K_{ip}	1.5
K_{mB}	0.59
K_{jP}	2.3
K_{jA}	0.017
K_{jII}	7.6

Parameter	[mmol/l]
K_{ib}	5.9
K_{iq}	1.2
K_{mQ}	130
K_{jQ}	1.2
K_{jI}	7.6
K_{eq}	155 *

Tabelle 12: Hexokinase: Verwendete Parameter zur kinetischen Modellierung in Gleichung 38 (* [-])

7.2 STABILITÄT DER ENZYME

Zur erfolgreichen Durchführung der kontinuierlichen Produktion ist eine ausreichende Stabilität der Enzymaktivität unabdingbare Voraussetzung. Eine Inaktivierung ist mit einem irreversiblen Verlust der nativen Quartär- und Tertiärstruktur verbunden. Es sind eine Vielzahl unterschiedlicher auslösender Faktoren bekannt /34/:

- Physikalische Ursachen
 - a. Temperatur
 - b. Mechanische Kräfte
 - c. Strahlung
- Chemische Ursachen
 - e. pH-Wert
 - f. Wasserstoffbrückenbildner
 - g. Salze
 - h. Organische Lösungsmittel
 - i. Oberflächenaktive Stoffe
 - j. Oxidationsmittel
 - k. Schwermetalle
 - l. Chelatbildner
- Biologische Ursachen
 - m. Proteasen

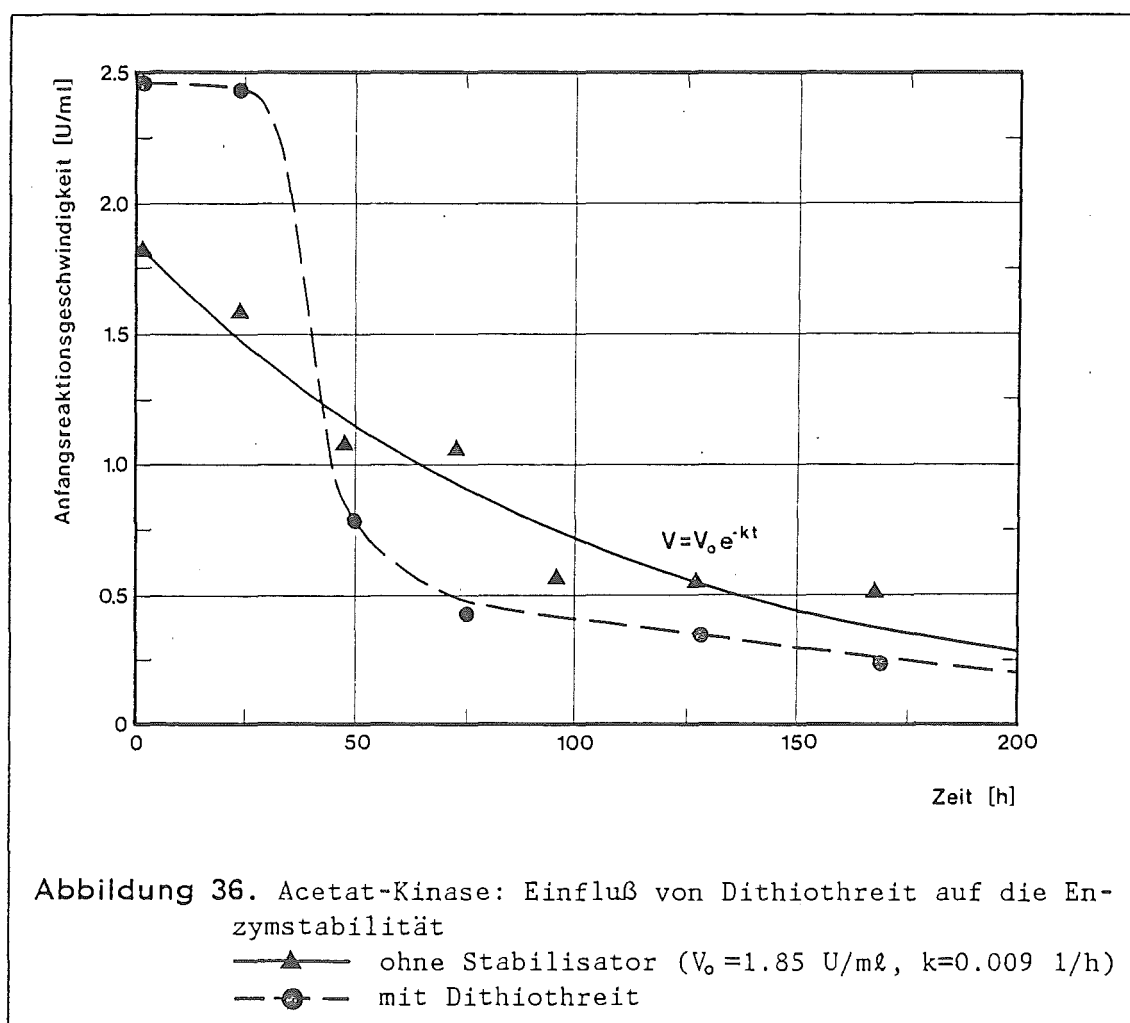
Eine Reihe der aufgeführten Ursachen sind im vorliegenden Fall von vornherein nicht gegeben. Beispielsweise sind Proteasen bei den verwendeten hochgereinigten Enzymen ebenso wenig wie Chelatbildner, Schwermetalle, Detergentien oder andere organische Verbindungen in den Lösungen vorhanden. Durch die festgelegten Randbedingungen zum Reaktorbetrieb ist der Einfluß von Temperatur, pH und Ionenstärke weitgehend vorbestimmt. Die Temperatur stellt dabei einen Kompromiß zwischen Aktivität und Stabilität dar, während der optimale pH-Wert der Stabilität im allgemeinen mit dem der Aktivität zusammenfällt. Der Wirkung mechanischer Kräfte und von Oxidantien ist von den verbleibenden Faktoren das größte Interesse entgegenzubringen. Bereits bei der Konstruktion des Enzymmembranreaktors ist der Denaturierung durch mechanische Beanspruchung der Enzyme Beachtung zu schenken.

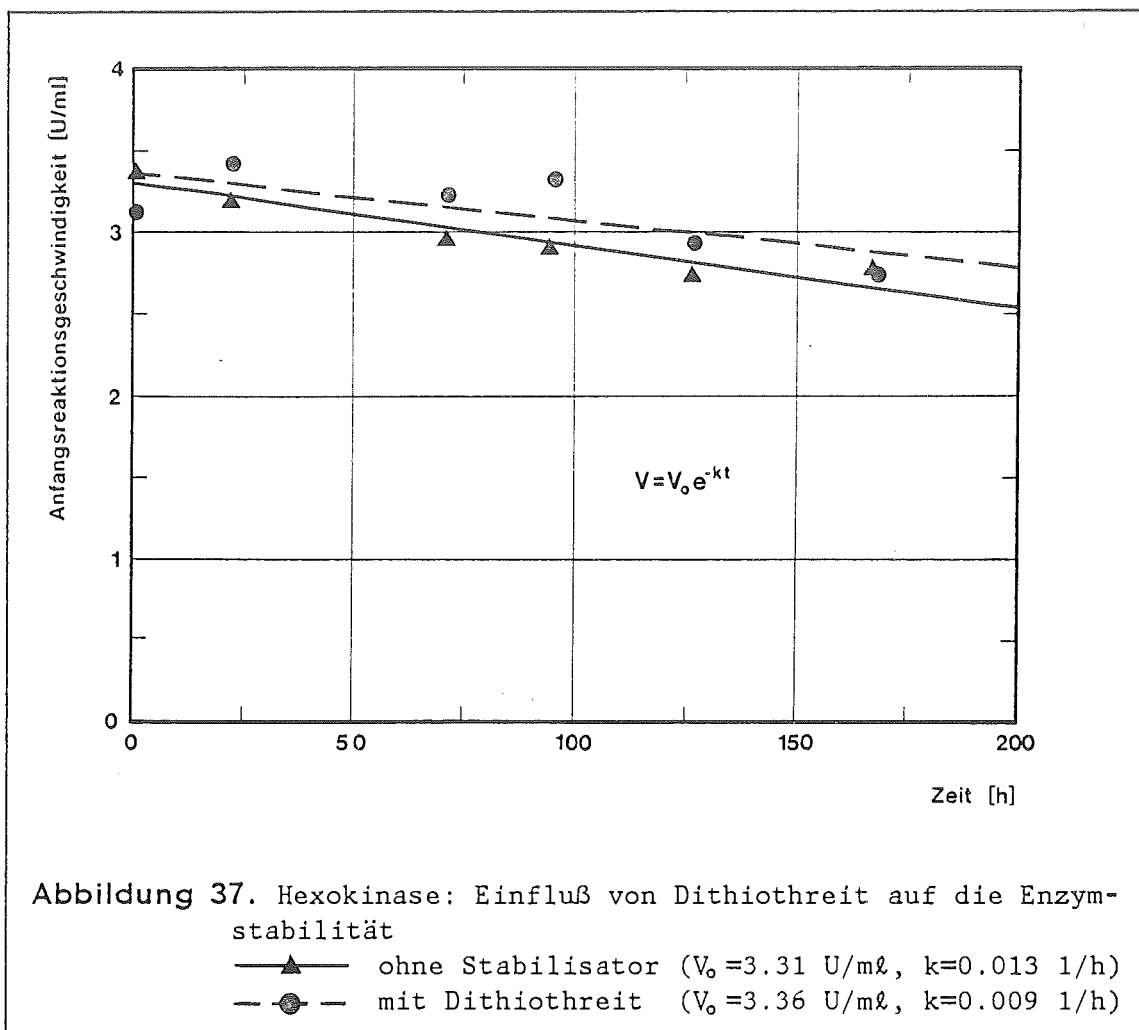
Da sowohl von Hexokinase und von Acetat-Kinase bekannt ist, daß sie empfindliche Schwefel-Gruppen im aktiven Zentrum besitzen, ist der Schutz vor Oxidation vorrangig. Thiolverbindungen wie Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT) sind dazu als bewährte Zusätze bekannt. Als eher

unspezifisch wirkender Stabilisator wurde die Wirkung von Proteinzusatz (Rinderserumalbumin, BSA) geprüft.

Bei der Stabilitätsuntersuchung wurden nicht nur die Enzyme sondern auch die Coenzyme unter Reaktionsbedingungen über einen Zeitraum von bis zu 850 Stunden getestet. Ihre Desaktivierung wurde einzeln in thermostatisierten Standproben gemessen. Die Zusammensetzung der Proben entsprach einer zu 70% umgesetzten Reaktorlösung. Ein stabilisierender Einfluß von Substraten und Produkten ist daher von vornherein gegeben, er wurde nicht näher bestimmt.

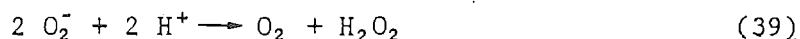
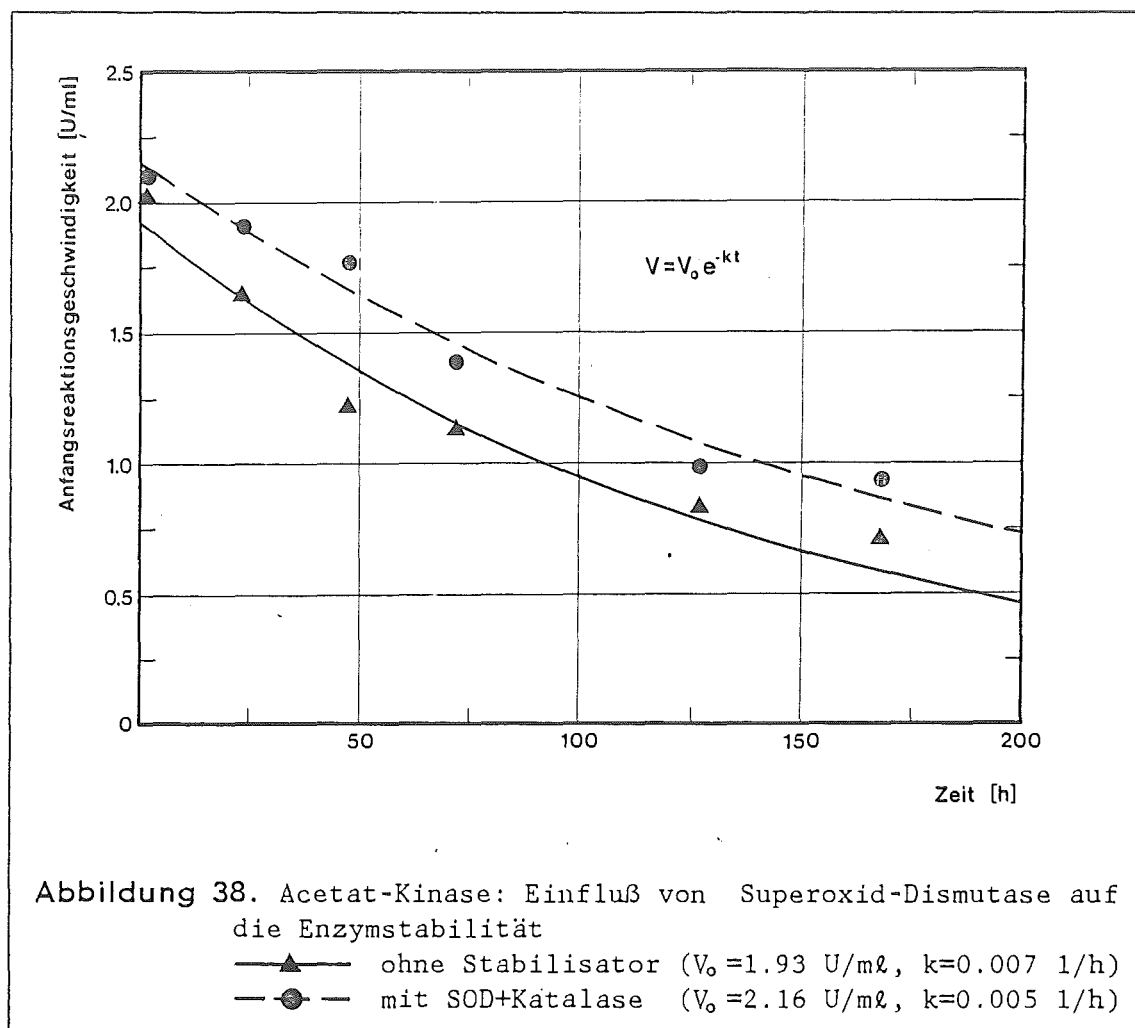
Der zeitliche Verlauf der Acetat-Kinaseaktivität mit Dithiothreitol-zusatz ist in Abbildung 36 dargestellt. Die zu Beginn zu beobachtende Steigerung der Aktivität um 30-40% ist auf die Reduktion von Disulfidbindungen und Sulfensäureresten zu aktiven Thiolgruppen zurückzuführen. Bei einer Dithiothreitolkonzentration von 2 mmol/l tritt bis zu einem Zeitraum von ca. 30 Stunden kein merklicher Verlust ein. Danach





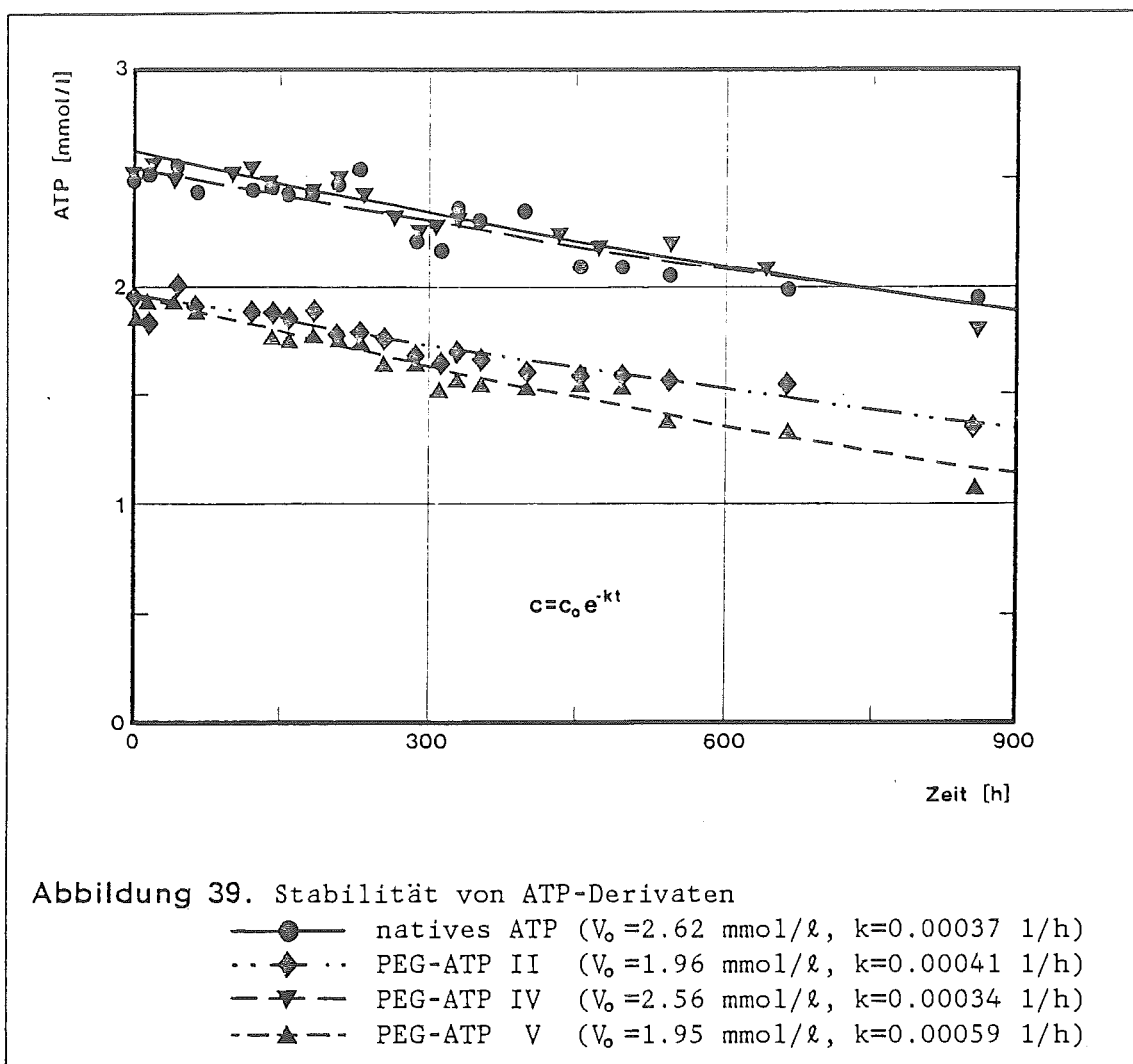
ist der Schutz verbraucht und es kommt zu einem rapiden Abfall der Enzymaktivität. Eine Erhöhung der DTT-Konzentration bewirkt eine Verlängerung des Schutzes. Standzeiten von 500 Stunden ohne Aktivitätsverlust, wie sie von Langer beschrieben werden /68/, wurden allerdings nicht erreicht. Die Geschwindigkeit der Desaktivierung kann durch eine Reaktion erster Ordnung beschrieben werden. Ohne Stabilisator beträgt die gemessene Geschwindigkeitskonstante 0.009 1/h. Der Einfluß von DTT auf Hexokinase bewirkt kein so extremes Verhalten. Die Desaktivierungsrate verringert sich leicht von 0.0013 auf 0.0009 1/h (Abbildung 37). Eine stabilisierende Wirkung von Albumin war in beiden Fällen nicht signifikant.

Da niedermolekulare Zusätze wie Dithiothreit beim Betrieb eines Reaktors kontinuierlich nachdosiert werden müssen und zusätzliche Unkosten verursachen, wurde die Wirkung des Enzyms Superoxid-Dismutase erprobt. Als Makromolekül bleibt sie im Enzymmembranreaktor erhalten. Superoxid-Dismutase katalysiert die Reaktion:



Das Enzym arbeitet als Radikalfänger. Wird das ebenfalls mit Thiolgruppen reagierende Produkt Wasserstoffperoxid durch Katalase aus der Lösung entfernt, kann eine präventive Wirkung vor der Oxidation von SH-Gruppen der Enzyme erreicht werden. Superoxid- und Hydroxylradikale entstehen bereits in Gegenwart katalytischer Spuren Mengen Metallionen (Fe und Cu).

Der Einfluß von Superoxid-Dismutase bei der Inaktivierung von Enzymen ist bereits an einigen Beispielen beschrieben worden /94,95/. Die Abbildung 38 zeigt am Beispiel der Acetat-Kinase, daß die Dismutase bei den Standproben nur einen geringen Beitrag zur Stabilisierung liefert.



Die Desaktivierungsrate ging im dargestellten Versuch von 0.0071 auf 0.0054 1/h zurück.³

Die gemessenen Stabilitäten der polymergebundenen ATP-Derivate entsprechen der Desaktivierung des nativen Coenzym (Abbildung 39). In allen Fällen blieb die Rate kleiner als 0.0004 1/d. Die Zugabe von Magnesium (10 mmol/l) nach einer Standzeit von 240 Stunden führt zu keiner erhöhten Desaktivierung.

³ Die Superoxid-Dismutase wurde freundlicherweise von Frau Dipl.-Biol. B. Meier, Institut für Biotechnologie 2 der KFA Jülich, zur Verfügung gestellt.

8.0 KONTINUIERLICHE PRODUKTION

8.1 BETRACHTUNGEN ZUM REAKTORBETRIEB

Bevor kontinuierliche Produktionsversuche durchgeführt werden, soll auf der Basis der im vorigen Kapitel gewonnenen kinetischen Daten das Betriebsverhalten simuliert werden. Durch die Modellrechnung kann eine sinnvolle Optimierung der Produktion erreicht werden, indem eine Vielzahl der Parameter variiert wird. Grundlage der Rechnung ist das gekoppelte System von gewöhnlichen Differentialgleichungen 1. Ordnung, wie sie sich aus der Bilanzierung der Reaktanden ergeben. Die Gleichungen setzen sich aus einem Term für Verbrauch und Bildung durch die enzymatische Reaktion sowie aus einem Konvektionsterm zur Beschreibung des kontinuierlichen Zu- und Ablaufs zusammen:

- Massenbilanz Acetylphosphat (Substrat)

$$\frac{d[\text{AcP}]}{dt} = -v^{\text{AK}} + D \times ([\text{AcP}]_0 - [\text{AcP}]) - k_h [\text{AcP}] \quad (40)$$

mit $[\text{AcP}]$ mmol/l momentane Reaktorkonzentration Acetylphosphat
 $[\text{AcP}]_0$ mmol/l Acetylphosphatkonzentration im Zulauf
 v^{AK} U/ml Reaktionsrate Acetat-Kinase (Gleichung 37)
 D 1/min Verdünnungsrate
 k_h 1/min Hydrolysegeschwindigkeitskonstante

- Massenbilanz Glucose (Substrat)

$$\frac{d[\text{Glc}]}{dt} = -v^{\text{HK}} + D \times ([\text{Glc}]_0 - [\text{Glc}]) \quad (41)$$

mit $[\text{Glc}]$ mmol/l momentane Reaktorkonzentration Glucose
 $[\text{Glc}]_0$ mmol/l Glucosekonzentration im Zulauf
 v^{HK} U/ml Reaktionsrate Hexokinase (Gleichung 38)

- Massenbilanz Acetat (Produkt)

$$\frac{d[\text{Ac}]}{dt} = v^{\text{AK}} - D \times [\text{Ac}] + k_h [\text{AcP}] \quad (42)$$

mit $[\text{Ac}]$ mmol/l momentane Reaktorkonzentration Acetat

- Massenbilanz Glucose-6-phosphat (Produkt)

$$\frac{d[\text{G6P}]}{dt} = v^{\text{HK}} - D \times [\text{G6P}] \quad (43)$$

mit $[\text{G6P}]$ mmol/l momentane Reaktorkonzentration Glucose-6-phosphat

- Massenbilanzen PEG-ATP und PEG-ADP

$$\frac{d[\text{ATP}]}{dt} = - \frac{d[\text{ADP}]}{dt} = v^{\text{AK}} - v^{\text{HK}} \quad (44)$$

Da das Coenzym im Reaktor zurückgehalten wird, entfällt der Konvektionsterm für das ATP/ADP. Die Adenosinphosphate werden lediglich ineinander umgewandelt. Bei den Massenbilanzen für Acetylphosphat und Acetat ist zusätzlich die Hydrolyse von Acetylphosphat berücksichtigt.

Die Nettoreaktionsgeschwindigkeiten der beiden Enzyme berechnen sich mit den aktuellen Konzentrationen der Reaktanden nach Gleichung 37 und den dazugehörigen in der Tabelle 11 angegebenen Konstanten. Als Hydrolysegeschwindigkeit des Acetylphosphats wird die unter den gege-

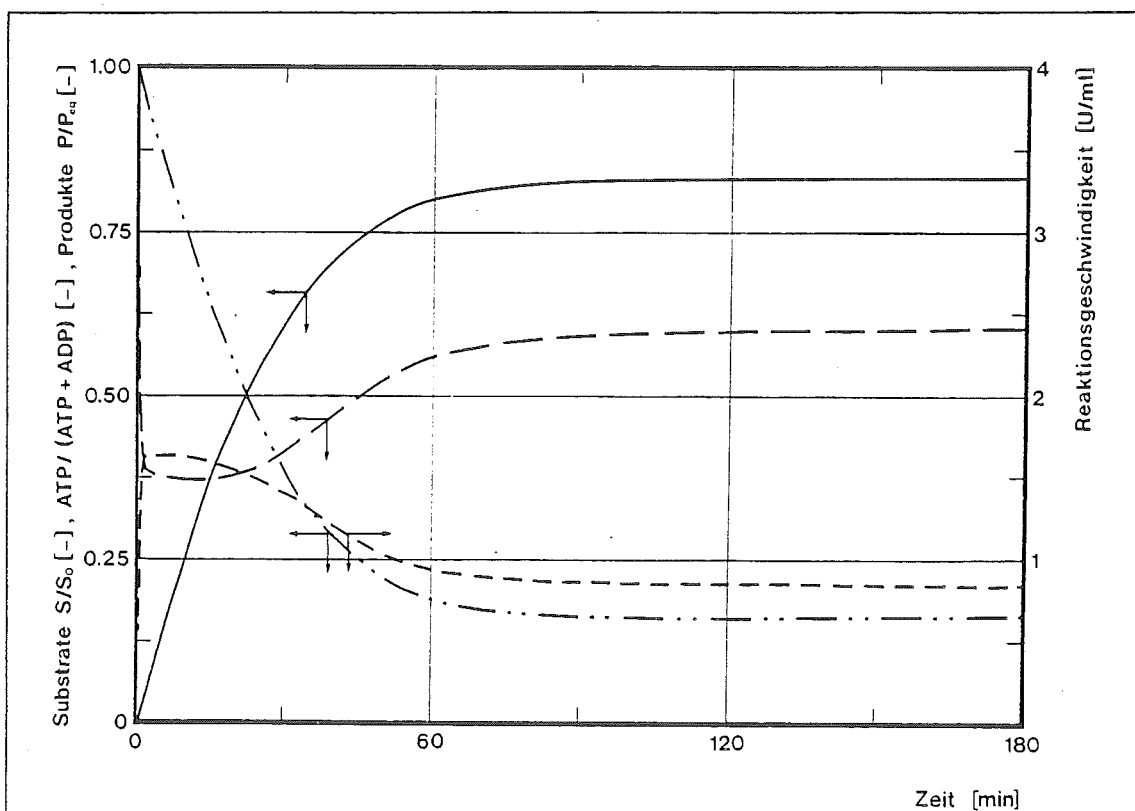
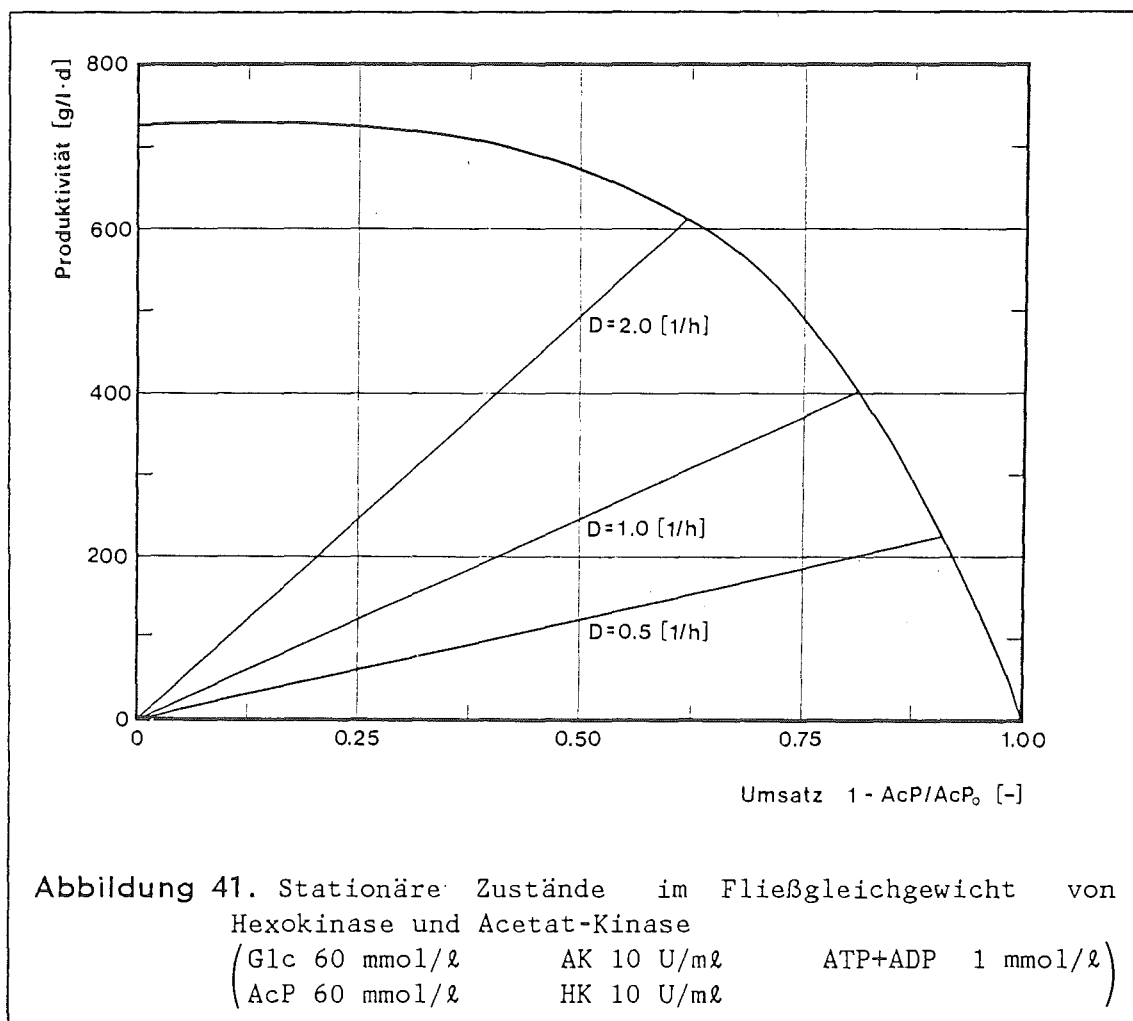


Abbildung 40. Anfahrvorgang bei der kontinuierlichen Produktion im Enzymmembranreaktor. Numerische Lösung der Massenbilanzen nach Runge-Kutta

.. — ..	Substrate	— — — —	Produkte
— — — —	ATP-Anteil	- - - - -	Reaktionsrate
$\left(\begin{array}{lll} \text{Glc } 60 \text{ mmol/l} & \text{AK } 10 \text{ U/ml} & \text{ATP+ADP } 1 \text{ mmol/l} \\ \text{AcP } 60 \text{ mmol/l} & \text{HK } 10 \text{ U/ml} & D \quad 1 \text{ l/h} \end{array} \right)$			

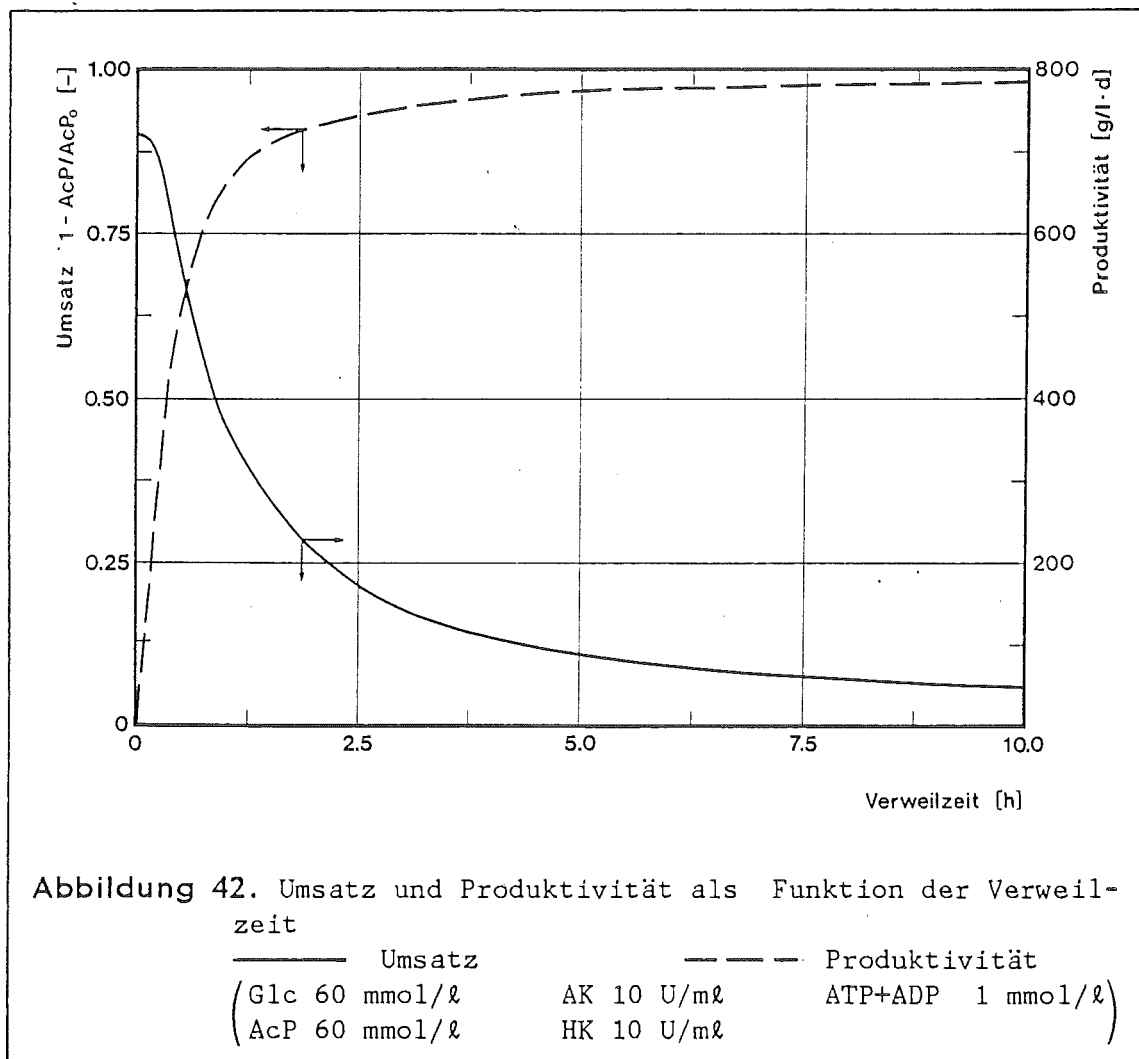
benen Bedingungen von Temperatur (25°C) und Magnesiumkonzentration (10 mmol/l) gemessene Rate von 0.001 1/h eingesetzt.

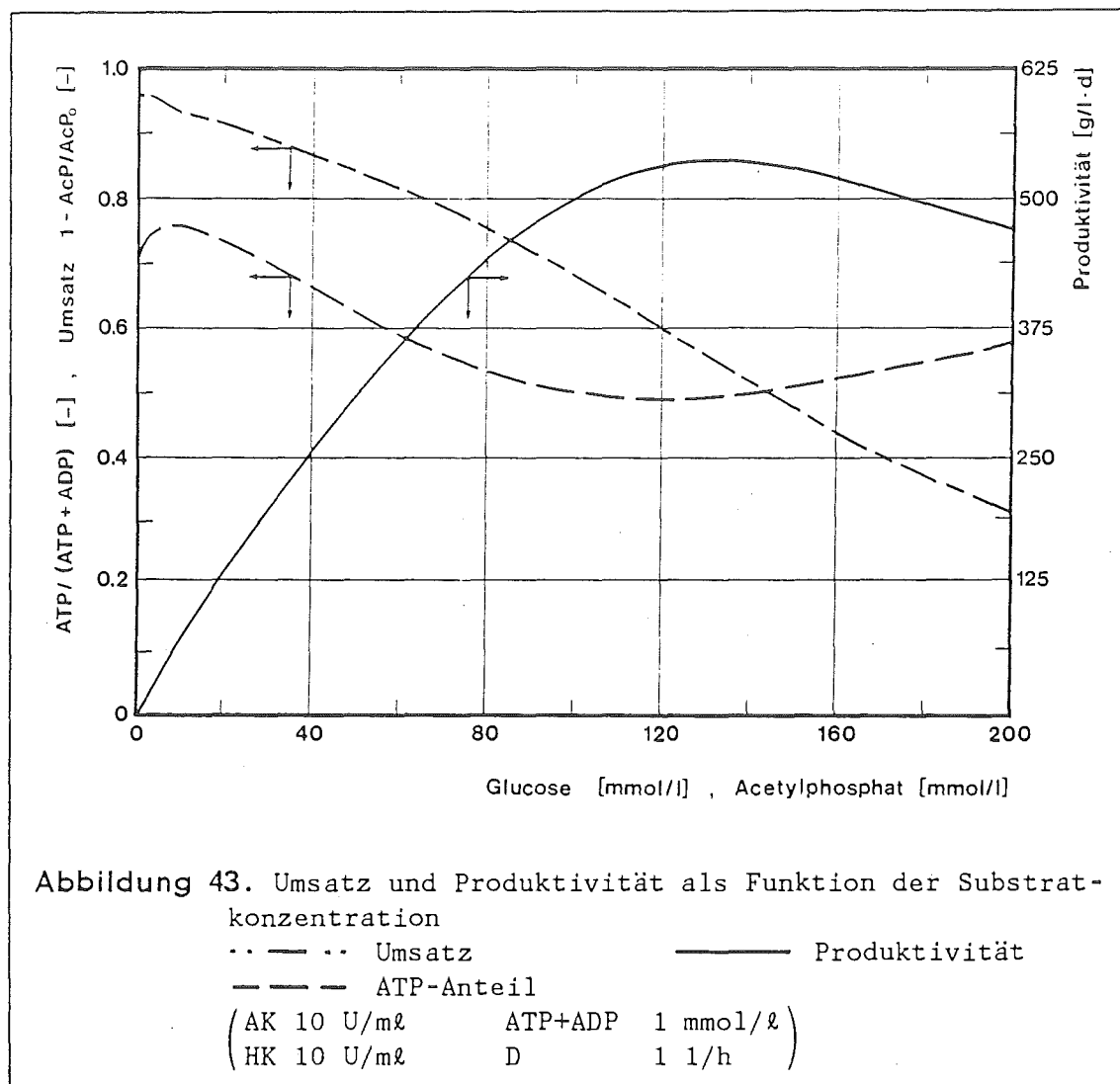
Die Konzentrationen der Komponenten im stationären Zustand kann durch ein Optimierungsverfahren ermittelt werden. Die zu minimierende Zielfunktion ist das Residuum der Reaktionsgeschwindigkeiten von Acetat-Kinase und Hexokinase, sie wird im stationären Fall zu Null. Eine andere Methode ist die numerische Lösung der Massenbilanzen mittels eines Verfahrens nach Runge-Kutta. Eine solche instationäre Behandlung erlaubt nicht nur die Berechnung des Anfahrvorgangs bis hin zum sich einstellenden Gleichgewicht, sondern vermag zusätzlich seine zeitliche Änderung aufgrund berücksichtigter Enzymdesaktivierung oder Retentionsverluste nachzubilden. Abbildung 40 zeigt den Verlauf eines Anfahrvorgangs. Die Anfangsbedingungen und Prozeßparameter des Beispiels orientieren sich an späteren Produktionsversuchen. Innerhalb der ersten Minute verbraucht die Hexokinase den Anteil des ATP am Gesamtadenosinphosphat, bis die ATP-Konzentration zum limitierenden



Faktor wird. Im gleichen Zeitraum nimmt mit steigendem ADP-Anteil die Reaktionsgeschwindigkeit der Acetat-Kinase zu und führt zu einer raschen Gleichgewichtseinstellung von ATP und ADP. Die Substrate Acetylphosphat und Glucose werden danach solange abgebaut, bis die parallel sinkende Reaktionsgeschwindigkeit beider Enzyme den Wert des Konvektionsterms annimmt. Dieser Gleichgewichtszustand ist bereits nach zwei Verweilzeiten erreicht. Die Reaktionsrate von Acetat-Kinase ist gleich der Rate von Hexokinase.

An Rechnungen wie dieser ist letztlich nur der Umsatz von Interesse. Sie vermittelt allerdings auch einen besseren Einblick, da auch nicht meßbare Größen wie das aktuelle ATP/ADP-Verhältnis anschaulich dargestellt werden. Am in den Abbildungen eingetragenen ATP-Anteil lassen sich beispielsweise Verschiebungen der Enzymaktivitäten ablesen.





Die Betriebspunkte für den stationären Zustand des Enzymmembranreaktors zur kontinuierlichen Produktion von Glucose-6-phosphat sind in Abbildung 41 dargestellt. Der Konvektionsterm wird durch eine Gerade, deren Steigung der Verdünnungsrate proportional ist, repräsentiert. Der Zustand des Fließgleichgewichts ergibt sich dabei anschaulich aus dem Schnittpunkt der Konvektionsgeraden mit dem Graphen des Reaktionsterms. Der Umsatz ist hier und im folgenden immer auf das Acetylphosphat bezogen.

Im folgenden Abschnitt sollen Rechnungen zur Festlegung von Verdünnungsrate und den Konzentrationen der Reaktanden im kontinuierlichen Versuch durchgeführt werden.

Abbildung 42 macht klar, daß eine optimale Verweilzeit einen Kompromiß zwischen hoher Produktivität bei effektiver Nutzung der Enzymaktivität

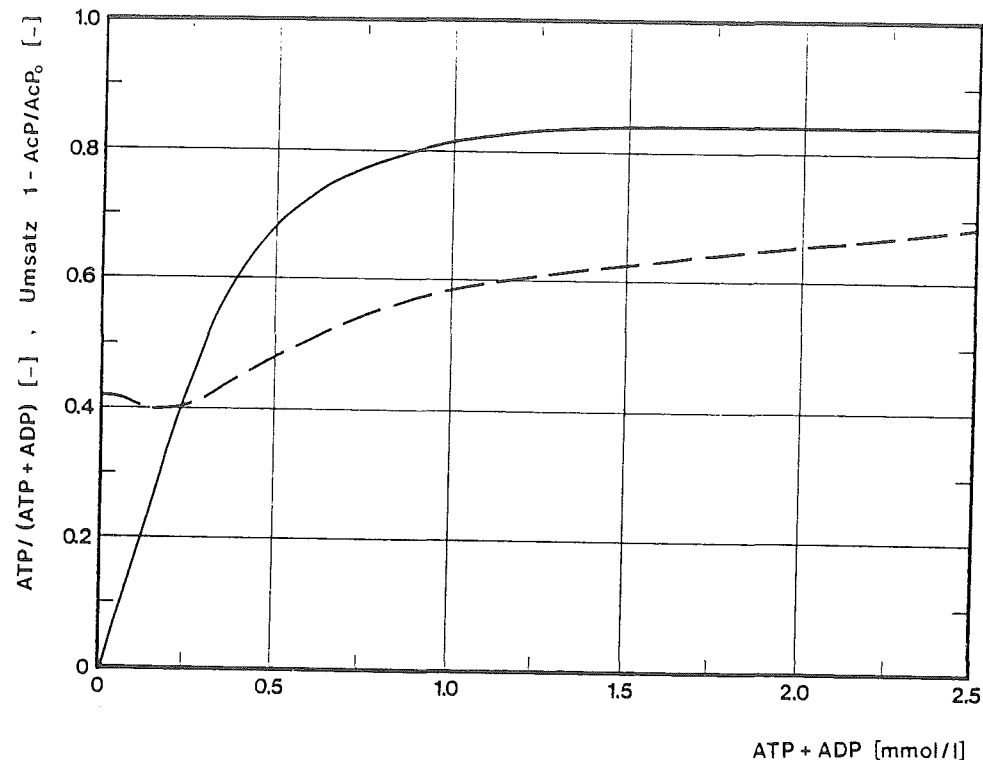
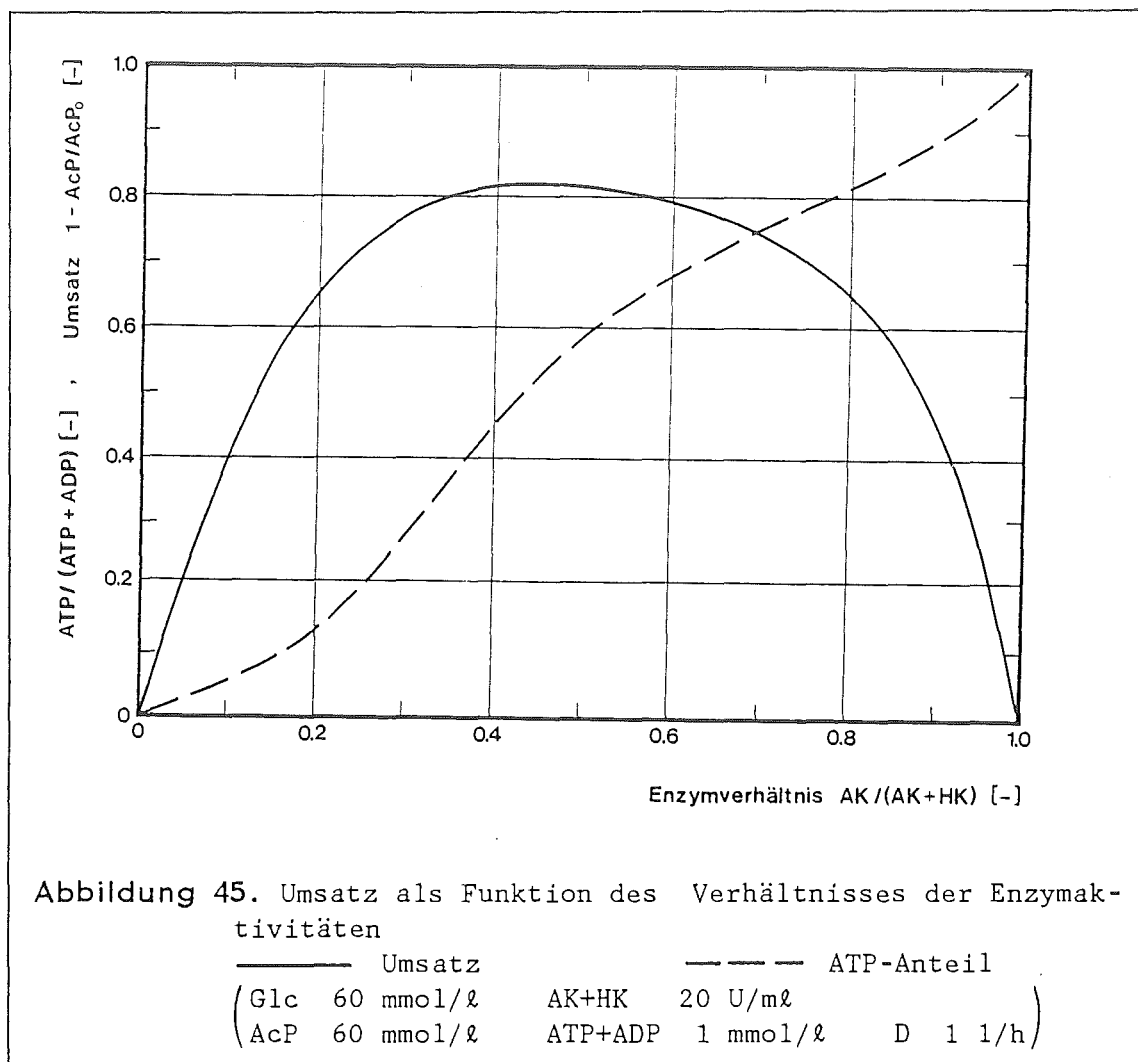


Abbildung 44. Umsatz als Funktion der Adenosinphosphatkonzentration

———— Umsatz	----- ATP-Anteil
(Glc 60 mmol/l	AK 10 U/ml
AcP 60 mmol/l	HK 10 U/ml
	D 1 1/h

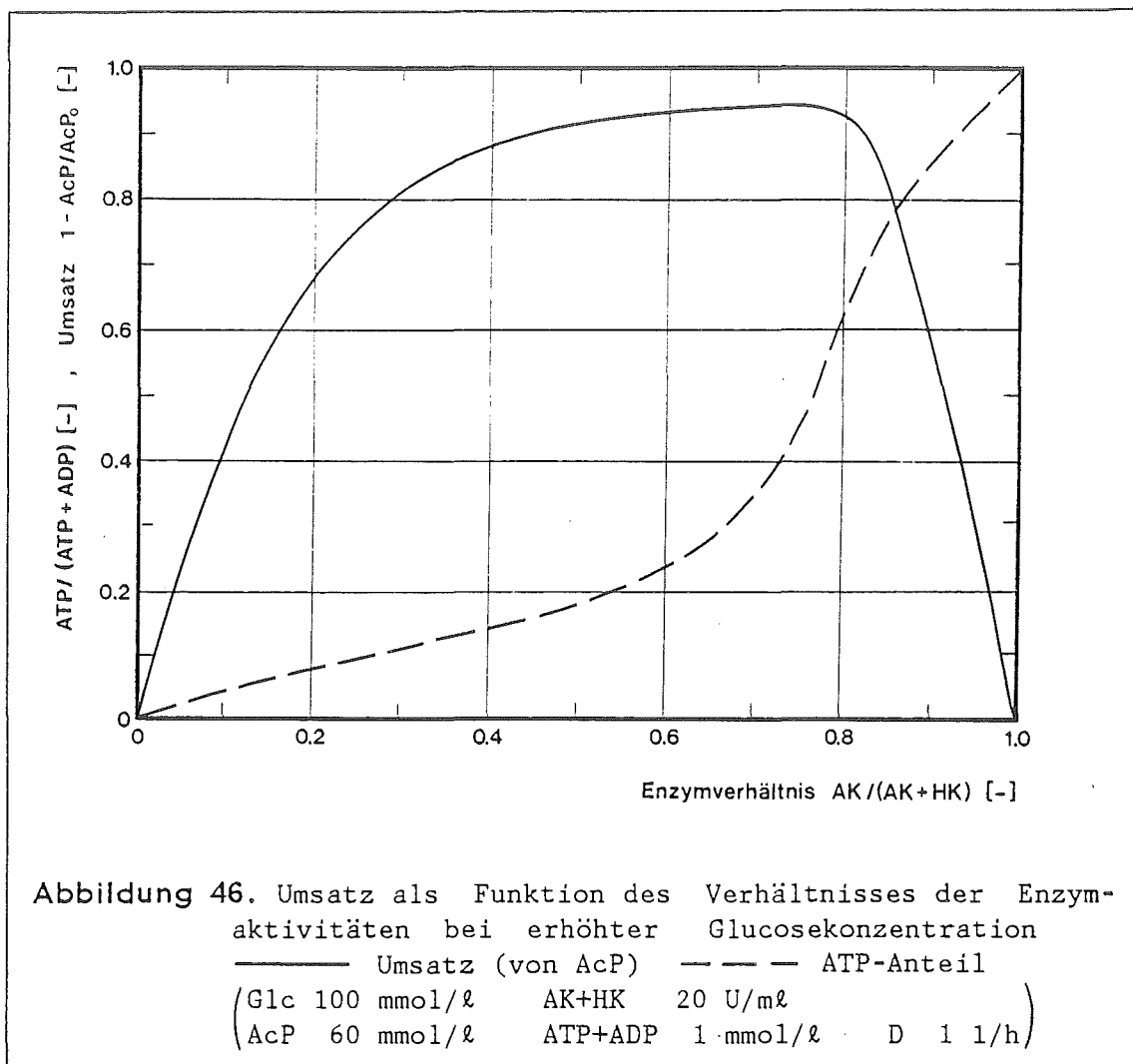
und einem hohen Umsatz darstellen muß. Die Wahl einer Verweilzeit wird sich daher an einer Kostenrechnung orientieren. Dies betrifft sowohl die Kosten für die Substrate als auch für Betriebskosten zur Produktabtrennung. So wird ein teures Substrat immer bei hohem Umsatz also langer Verweilzeit verwendet werden. Zusätzlichen Einfluß hat die Hydrolyse des Substrates. Sie wächst mit sinkendem Verhältnis von Enzymreaktion und Zerfall. Bei einer Enzymaktivität von 1 U/ml und den in Abbildung 42 angegebenen Bedingungen macht sich die vorhandene Hydrolyse von Acetylphosphat mit einem Verlust zwischen 1 bis 2% bemerkbar. Bei der enzymatischen Aktivität von 10 U/ml werden 60 Minuten als praktische Verweilzeit festgelegt. Bei höheren Verweilzeiten steigt der Umsatz nur noch in geringem Maße, dagegen sinkt die Produktivität weiter ab.

Bereits die gemessenen Inhibierungen der Enzyme haben klar gemacht, daß die Substratkonzentrationen nicht beliebig erhöhbar sind. Dies betrifft vor allem die Wirkung von Acetylphosphat auf die Hexokinaseak-



tivität. Die Reaktionsgeschwindigkeit und damit die Reaktorproduktivität erreicht bei Konzentrationen von 130 mmol/l Acetylphosphat bzw. Glucose ihren maximalen Wert (Abbildung 43). Der mit zunehmender Substratkonzentration abnehmende Umsatz erfordert wiederum einen Kompromiß. Angesichts der zur Verfügung stehenden Acetylphosphatmengen erschien eine Konzentration von 60 mmol/l als geeignet, eine effektive Nutzung der Enzymaktivitäten und einen ausreichenden Umsatz zu gewährleisten.

Die Rechnung zur Festlegung der Adenosinphosphatkonzentration zeigt einen Anstieg des erreichbaren Umsatzes bis zu einer Reaktorkonzentration von 1 mmol/l PEG-ATP/ADP (Abbildung 44). Eine weitere Steigerung führt zu keiner wesentlichen Verbesserung mehr. Die Überschußinhibierung der Enzyme macht sich erst bei mehr als 1.8 mmol/l in einer geringen Abnahme des Umsatzes bemerkbar. Die Konzentration für die anschließenden Produktionsversuche beträgt 1.25 mmol/l PEG-ATP/ADP. Sie



sichert ausreichende Aktivität ohne eine unnötige Viskosität der Reaktortlösung zu verursachen. Wie bei der Enzymdosierung gilt es beim Coenzym auf einem niedrigen Konzentrationsniveau zu arbeiten, da sonst eine Nachdosierung zum Ausgleich von desaktiviertem Material eingeschränkt wird (vgl. Kapitel 3.1).

Eine weitere Frage richtet sich auf das optimale Verhältnis der Enzymaktivitäten von ATP-Verbrauch und -Regenerierung. Die unterschiedlichen K_m -Werte und Inhibierungskonstanten für das Coenzym lassen bereits erwarten, daß der höchste Umsatz nicht bei einem Enzymverhältnis von 1:1 erreicht wird. Abbildung 45 zeigt, daß sich zwischen einem Acetat-Kinase-Anteil an der Gesamtzymaktivität von 35 und 55% nur wenig am Umsatz ändert. Kleinere Anteile bewirken eine zunehmende Limitierung. Dieses wird auch an der niedrigen ATP-Konzentration erkennbar. Bei hohem Überschuß an Acetat-Kinase tritt umgekehrt die

Limitierung seitens Hexokinase auf. Das meiste Coenzym liegt als ATP vor.

Der Einfluß der Aktivitätsverhältnisse macht sich während des kontinuierlichen Betriebs dann bemerkbar, wenn die Einzelenzyme einer unterschiedlich schnellen Desaktivierung unterliegen. Das optimale Verhältnis ist kein fester Wert, sondern kann durch die Substratkonzentrationen erheblich verschoben werden. Erhöht man beispielsweise die Glucosekonzentration auf 100 mmol/l, steigt die Hexokinaseaktivität an. Dies führt nicht nur zu einer Steigerung des Umsatzes, sondern verlagert das Optimum zu einem entsprechend höheren Acetat-Kinase-Anteil (Abbildung 46). Der Verlauf der ATP-Konzentration zeigt, daß bis zu einem Anteil von 70% Acetat-Kinase das limitierende Enzym ist. Der Bereich mit hohem Umsatz ist deutlich verbreitert.

Als Ergebnis der mit durch die Modellierung gewonnenen Abschätzungen lassen sich für die anschließenden Produktionsversuche folgende Randbedingungen und Prozeßparameter angeben:

- Substratlösung mit 60 mmol/l Acetylphosphat und 100 mmol/l Glucose
- Reaktorkonzentration des Coenzym 1.25 mmol/l
- Anfangsaktivität der Enzyme je 10 U/ml
- Einzustellende Verdünnungsrate nicht größer als 1 l/h

8.2 PRODUKTION VON GLUCOSE-6-PHOSPHAT

Bevor die Durchführbarkeit der kontinuierlichen Produktion in Langzeitversuchen bewiesen wurde, ist das Verhalten der Enzyme und PEG-ATP unter Reaktorbedingungen überprüft worden. Das besondere Interesse richtet sich dabei auf die Stabilität der Aktivitäten, die sich von denen in Standproben gemessenen Werten unterscheiden. Für die Erhöhung der Verluste sind folgende Ursachen nachweisbar:

Membranbelag: Nach dem Einspritzen von Coenzym und Enzymen ist ein schneller Verlust der Aktivitäten meßbar. Nach einigen Stunden Betriebszeit pegeln sich die Verlustraten auf einen kleineren Wert ein. Als Ursache ist eine Belegung der Membran durch Adsorption und Konzentrationspolarisation anzunehmen. Wie aus den in Kapitel 3.1 dargestellten Eigenschaften der Ultrafiltration hervorgeht, ist die Größe des Belags eine Funktion des Membranflusses. Messungen mit dem Thin-channel-Reaktor ergaben für PEG-ATP innerhalb des ersten Stunden einen Rückgang des gelösten Anteils zwischen 60% (bei $F = 1.2 \text{ l/m}^2\text{h}$) und 80% (bei $F = 3.3 \text{ l/m}^2\text{h}$). Ein anfängliches Ausspülen an niedermolekularen Bestandteilen des Polymers ist dem Verlust

durch Belagbildung überlagert, spielt aber angesichts der engen Größenverteilung des verwendeten PEG keine Rolle. Gleiches gilt für die Verbesserung der Retention durch die Belagbildung.

Elution: Da die Retention nie vollständig ist, werden gemäß Gleichung 11 abhängig von der Verdünnungsrate die Polymere nach und nach ausgespült. Die Retention des polymergebundenen Coenzym wurde bereits mit mindestens 0.994 angegeben. Vergleicht man die daraus errechnete Verlustrate mit der gemessenen Desaktivierungsrate in Standproben (Kapitel 7.2), beträgt der Elutionsverlust bis zum 50fachen der Standdesaktivierung. Die Retention der Enzyme ist aufgrund ihres höheren Molekulargewichts und der globulären Form nahezu eins.

Mechanische Belastung: Die desaktivierende Wirkung von mechanischen Kräften ist in einer Reihe von Arbeiten gut untersucht worden /96,97/. In den durchgeführten Versuchen wurde sie insbesondere im Vergleich von Thin-channel-Reaktor und Rührzelle deutlich. Abhängig von der Umpumpgeschwindigkeit im Thin-channel-System wuchs die Desaktivierungsgeschwindigkeit der Hexokinase gegenüber der gerührten Zelle auf den doppelten Wert. Acetat-Kinase erwies sich als etwas stabiler. Die mit der gleichen Kreislaufpumpe von Jandel /97/ erzielten Ergebnisse belegen, daß die Strömung in der Ultrafiltrationseinheit gegenüber der desaktivierenden Wirkung der Pumpe von untergeordneter Bedeutung ist.

Als erste Konsequenz wurde vor der Zugabe von PEG-ATP und den Enzymen bei Versuchsbeginn Rinderserumalbumin (1.5 g/l) eingespritzt. Am Druckanstieg von ca. 50 mbar kann erkannt werden, daß sich ein Membranbelag ausbildet. Damit wird die Membran bereits mit Protein belegt und der Verlust bei der anschließenden Zugabe von Enzymen und Coenzym deutlich vermindert. Die Verringerung der mechanischen Desaktivierung ist vor allem ein Problem der Kreislaufpumpe. Im verlangten Volumenstrombereich (5..20 l/h) stand keine geeignetere Pumpe als die vorhandene Zahnradpumpe zur Verfügung. Um die Desaktivierung klein zu halten, wurde sie im unteren Drehzahlbereich betrieben, auch wenn diese Maßnahme mit Nachteilen bei der Ultrafiltration verbunden ist.

In den kontinuierlichen Versuchen erwies sich der Zusatz von Dithiothreitol als das wirkungsvollste Mittel zum Erhalt der Enzymaktivität. Der Substratlösung wurden 0.5 mmol/l Dithiothreitol zugesetzt. Diese geringe Menge war vollständig ausreichend. Höhere Konzentrationen konnten keine Verbesserung bewirken. Die Verwendung der Superoxid-Dismutase blieb auf einen Versuch beschränkt, da keine stabilisierende Wirkung festzustellen war.

Abbildung 47 zeigt den Verlauf eines kontinuierlichen Produktionsversuchs im Thin-channel-System. Nach einer Einlaufzeit von 2.5 Stunden

hat die Produktkonzentration ihren stationären Wert erreicht. Die Startkonzentration der beiden Enzyme betrug 10 U/ml. Nach 33 Stunden ging der Umsatz stetig zurück. Als Ursache ergab sich insbesondere ein Rückgang der Hexokinaseaktivität auf 3.3 U/ml. Die Aktivität der Acetat-Kinase sank im gleichen Zeitraum auf 5.4 U/ml ab. Dies entspricht Desaktivierungsraten von 0.034 1/h für Hexokinase und 0.018 1/h für Acetat-Kinase. Hexokinase ist damit doppelt so schnell verbraucht wie Acetat-Kinase.

Durch Nachdosierung von Enzymen konnte der Umsatz wieder auf über 90% angehoben werden. Die zugegebene Enzymmenge (5.1 U/ml Hexokinase, 1.8 U/ml Acetat-Kinase) gleicht die desaktivierte Aktivität nicht vollständig aus, nach bereits 25 Stunden fällt der Umsatz wiederum ab. Bei der folgenden Enzymgabe wurden zusätzlich Superoxid-Dismutase und Katalase eingespritzt. Der Abstand der Nachdosierungen mit den gleichen Enzymgaben blieb nun konstant. Sie reichten ca. 40 Stunden zur Aufrechterhaltung der Produktion aus. Dies entspricht einer Verringerung der Desaktivierungsraten auf die Hälfte. Nach einer Betriebszeit von 370

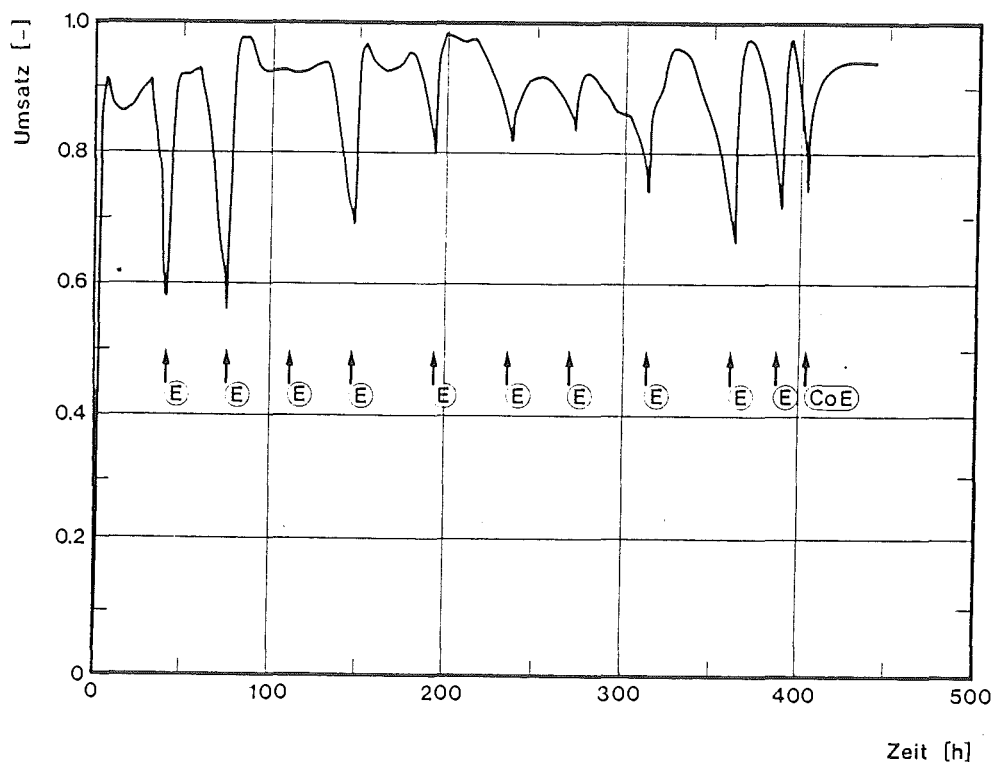
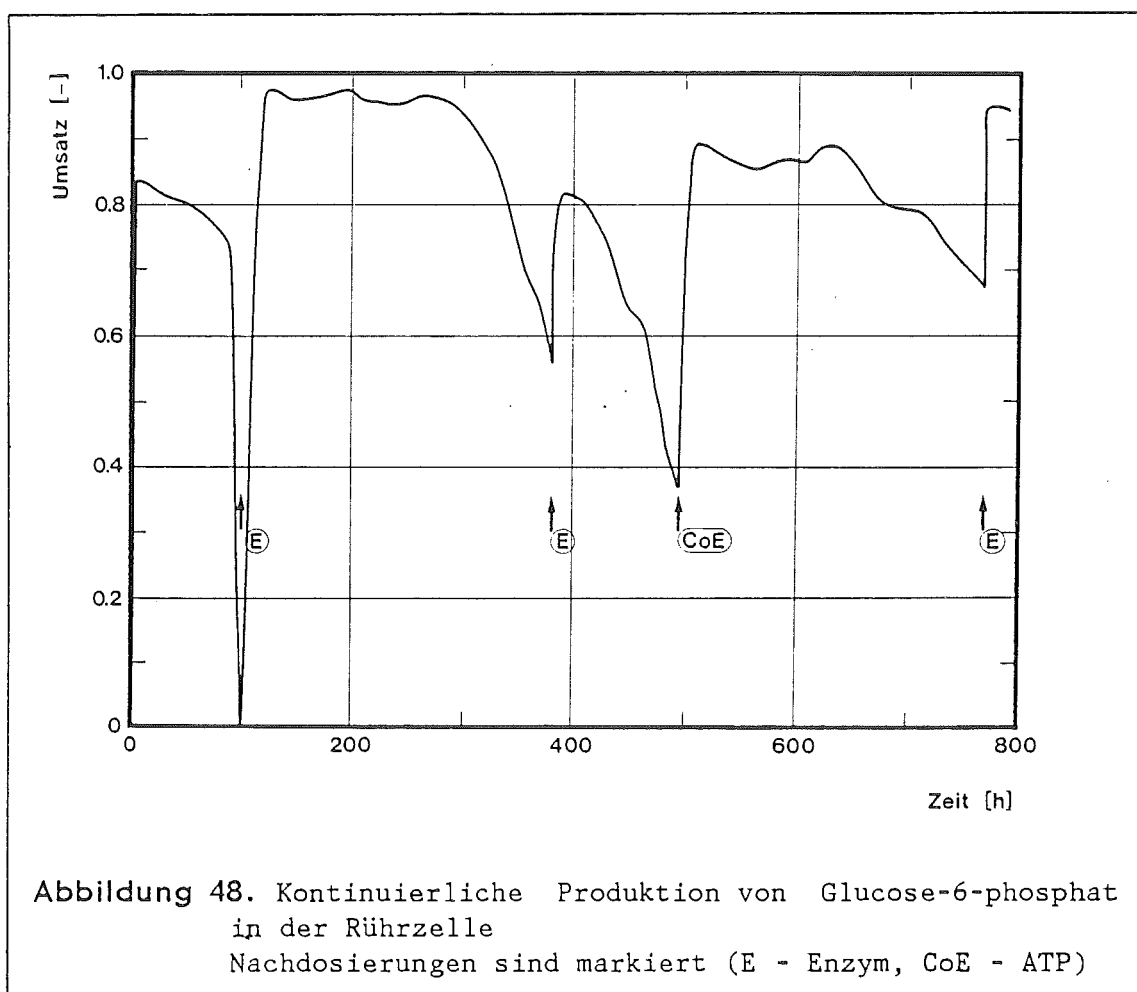


Abbildung 47. Kontinuierliche Produktion von Glucose-6-phosphat im Thin-channel-System
Nachdosierungen sind markiert (E - Enzym, CoE - ATP)

Stunden und insgesamt neunmaligem Nachdosieren machte sich die abnehmende Coenzymkonzentration immer stärker bemerkbar. Die Enzymaktivität mußte durch immer kürzer werdende Abstände der Zugaben hoch gehalten werden, damit der Umsatz aufrecht erhalten werden konnte. Nach einer Betriebszeit von 430 Stunden wurde der Versuch beendet. Um ihn weiterzuführen, wäre eine Nachdosierung von PEG-ATP erforderlich gewesen.

Auf der Basis der in dem Experiment ermittelten 'praktischen' Desaktivierungsraten kommt der Anwendung der Modellrechnung bei weiteren kontinuierlichen Versuchen eine große Bedeutung zu. Durch Berücksichtigung der Desaktivierung als eine die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (Gleichung 37) vermindernde Größe läßt sich das dynamische Verhalten des Reaktors simulieren und damit voraussagen. Die Rechnung brachte einen sich mit den Umsatzmessungen deckenden Zeitablauf.

Der eigentliche Wert der Modellrechnung liegt allerdings nicht in der Beschreibung des Umsatzverlaufs, sondern bei der Unterstützung der Betriebsführung. Noch bevor eine deutliche Abnahme des Umsatzes ein-



Substratlösung Trispuffer, pH 7.6	200	mmol/l
MgCl	10	mmol/l
Glucose	100	mmol/l
Acetylphosphat	60	mmol/l
Dithiothreitol	0.5	mmol/l
Temperatur	25	°C

Reaktortyp	Thin-Channel	Rührzelle	"
Produkt spezifischer Enzym- verbrauch Hexokinase	13.76	3.92	U/g
Acetat-Kinase	6.30	3.92	U/g
Verdünnungsrate	0.75	1.00	1/h
durchschnittl. Umsatz	0.87	0.79	-
" Produktivität	10.2	12.4	g/l h
Zyklenzahl	13600	19500	-

Tabelle 13: Leistungsmerkmale zur kontinuierlichen Glucose-6-phosphat-Produktion

tritt, kann die Art und die Größe einer Limitierung abgeschätzt werden. Durch die rechtzeitige Nachdosierung des mangelnden Enzyms oder Coenzyms läßt sich bei minimalen Katalysatorverbrauch ein hoher Umsatz mit maximaler Produktivität verwirklichen. Die Bedeutung der Modellierung ist im vorliegenden Fall nicht hoch genug einzuschätzen, da die Auswertung einer Reaktorprobe bei der Bestimmung der Enzymaktivitäten mit den beschriebenen Verfahren und die Bestimmung der Coenzymkonzentration mehrere Stunden dauern kann.

Im folgenden Produktionsversuch wurde neben verbrauchter Enzymaktivität auch desaktiviertes Coenym durch Nachdosierung ausgeglichen. Bei dem in Abbildung 48 dargestellten Experiment fand als Reaktortyp die Rührzelle Verwendung. Die zu Beginn von beiden Enzymen eingesetzte Aktivität von 15 U/ml war nach einer Betriebszeit von 90 Stunden nahezu verbraucht und machte die erste Nachdosierung erforderlich. Wie bereits beim Versuch im Thin-channel-Reaktor nahm die Geschwindigkeit der Enzymdesaktivierung innerhalb der ersten 100 Stunden erheblich ab. Der

Verlust an Hexokinaseaktivität war in der Rührzelle nicht höher als für Acetat-Kinase. Die erreichten Desaktivierungsraten lagen mit Werten bei 0.01 1/h nur wenig über den bei Standproben gemessenen Werten. Mit der zweiten Enzymzugabe nach 380 Stunden konnte der vorige Umsatz nicht wieder erreicht werden. Ursache ist wie im vorigen Experiment die abgesunkene Coenzym-Aktivität im Reaktor, die Nachdosierung von 0.7 mmol/l führt daher zum sofortigen Wiederanstieg der Produktbildung. Erst nach weiteren 270 Stunden erforderte der sinkende Umsatz eine erneute Enzymzugabe. Insgesamt konnte die kontinuierliche Produktion 800 Stunden aufrecht erhalten werden.

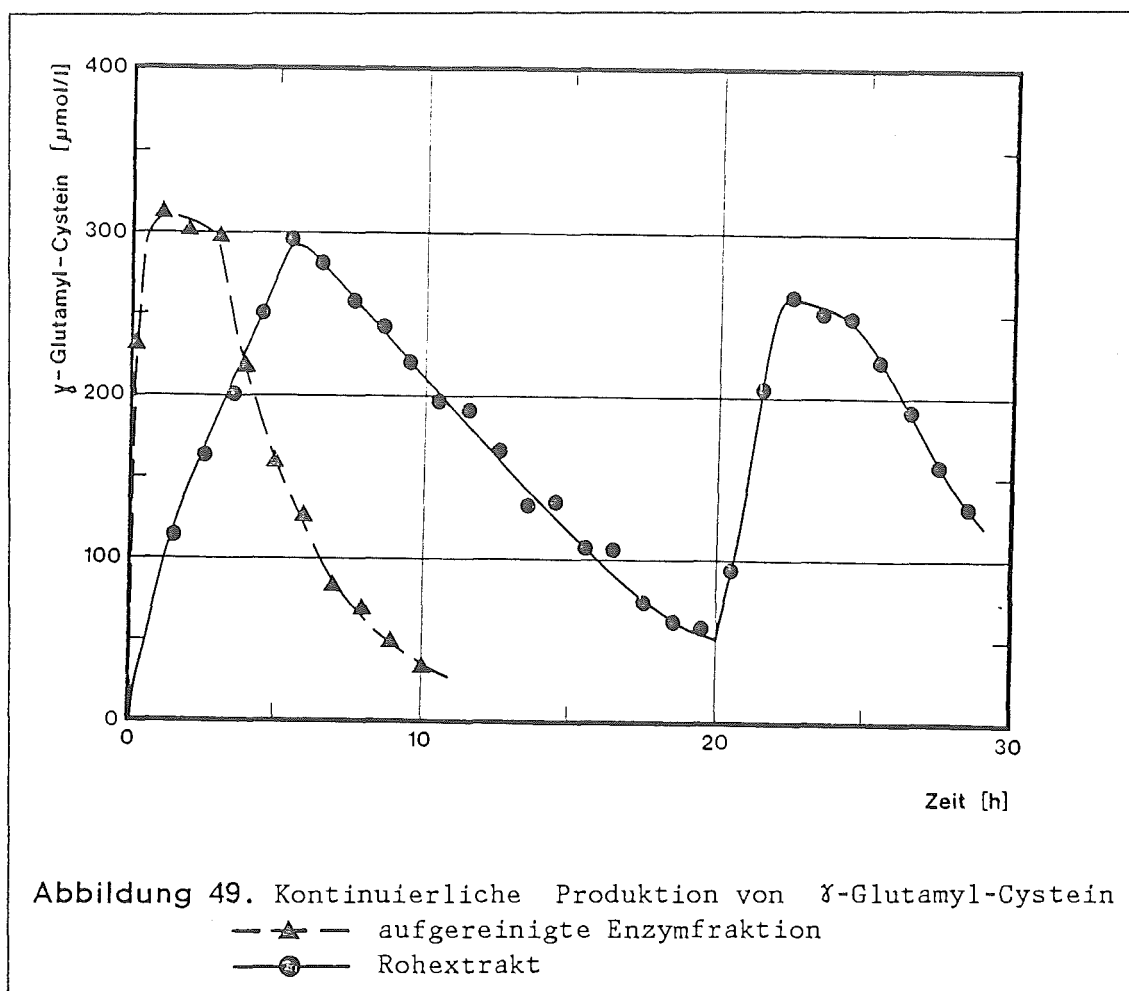
Die Geschwindigkeit des Coenzymverlustes wich bei beiden beschriebenen Versuchen nur unwesentlich voneinander ab. Der ermittelte Wert von 0.005 1/h liegt eine Zehnerpotenz über der in Standproben gemessenen Desaktivierung. Obwohl während der Versuche keine Untersuchung der Produktlösung auf ausgespültes Adenosin vorgenommen wurde, bietet die in den vorigen Experimenten gemessene Höhe der Retention eine schlüssige Deutung der beobachteten Differenz. Der Retentionswert errechnet sich nach Abzug der Desaktivierung zu 0.996.

In der Tabelle 13 sind die erzielten Ergebnisse der beiden kontinuierlichen Versuche abschließend zusammengefaßt.

8.3 PRODUKTION VON γ -GLUTAMYL-CYSTEIN

Nachdem sich das Prinzip des Enzymmembranreaktors am Beispiel der Glucose-6-phosphat-Produktion bewährt hat, sollen andere Anwendungen erprobt werden. Unter den in Tabelle 8 auf Seite 66 aufgeführten Enzymen, bei denen Aktivität mit polymergebundenem Coenzym nachgewiesen wurde, zählt γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase zweifellos zu den interessantesten. Als einziges der getesteten Enzyme ist γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase keine Phosphotransferase, sondern ein Beispiel einer nichtribosomalen Peptidsynthese. Sie katalysiert den ersten Schritt der Glutathion-Biosynthese. Der zweite von dem Enzym Glutathionsynthetase durchgeführte Schritt zum Tripeptid ist mit Polymer-ATP z.Zt. nicht möglich. Beide Enzyme wurden aus *Candida boidinii* isoliert.

Screening, Aufreinigung und Charakterisierung von γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase waren Gegenstand der Arbeit von Denda /66/. Die im folgenden beschriebenen Experimente zur kontinuierlichen Dipeptid-Produk-



tion wurden gemeinsam durchgeführt⁴. Sie haben demonstrativen Charakter und dienen nicht der Optimierung des Verfahrens. Als Reaktor fand die Rührzelle Verwendung. Die gewählten Randbedingungen und die Zusammensetzung der Substratlösung sind in der Tabelle 14 wiedergegeben.

Im ersten Versuch wurde eine aufgereinigte Enzymcharge eingespritzt. Die in hohem Überschuß eingesetzte Actetat-Kinase bewirkte, daß nahezu das gesamte Coenzym als ATP vorlag und die zur Verfügung stehende Synthetaseaktivität der den Umsatz begrenzende Faktor wurde und maximal genutzt werden konnte. Wie Abbildung 49 zeigt, erreichte der Umsatz nach 2 Stunden seinen Maximalwert. Bereits nach 4 Stunden machte sich die außerordentlich hohe Desaktivierung bemerkbar. Der beobachtete Konzentrationsabfall erfolgte exponentiell und erreicht mit 0.3 1/h nahezu

⁴ An dieser Stelle sei Frau Dipl.-Ing. G. Denda, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig-Stöckheim, nochmals für die gute Zusammenarbeit gedankt.

Substratlösung	
Trispuffer, pH 8	50 mmol/l
Dithioerythrit	10 mmol/l
Acetylphosphat	20 mmol/l
MgCl ₂	10 mmol/l
Cystein	10 mmol/l
Glutamin	10 mmol/l

Temperatur	37 °C
Verdünnungsrate	0.5 1/h
Acetat-Kinase	5 U/ml
PEG-ATP	1.0 mmol/l

Tabelle 14: Betriebsbedingungen zur kontinuierlichen γ -Glutamyl-Cystein-Synthese

die Geschwindigkeit einer Ausspülkurve ($D = 0.5 \text{ 1/h}$). Nach 10 Stunden war der Versuch beendet.

Beim folgenden Experiment wurde auf eine Aufreinigung der Synthetase verzichtet und ein Rohextrakt aus dem Zellaufschluß eingesetzt. Dieses brachte allerdings hohe Volumina mit sich, die in den Reaktor eingespritzt werden mußten. Nach Versuchsbeginn erforderte es daher einige Stunden, bis die Substratlösung einen hinreichenden Anteil am Reaktorinhalt erreicht hatte. Die Reaktionsgeschwindigkeit nahm dabei mit steigender Substratkonzentration zu. Noch bevor sich ein Gleichgewicht einstellen konnte, kam es nach einer Betriebszeit von 6 Stunden aufgrund der abnehmenden Enzymaktivität zu einer Abnahme der Produktionskonzentration. Eine Nachdosierung von Enzym-Rohextrakt konnte den Umsatz kurzfristig anheben.

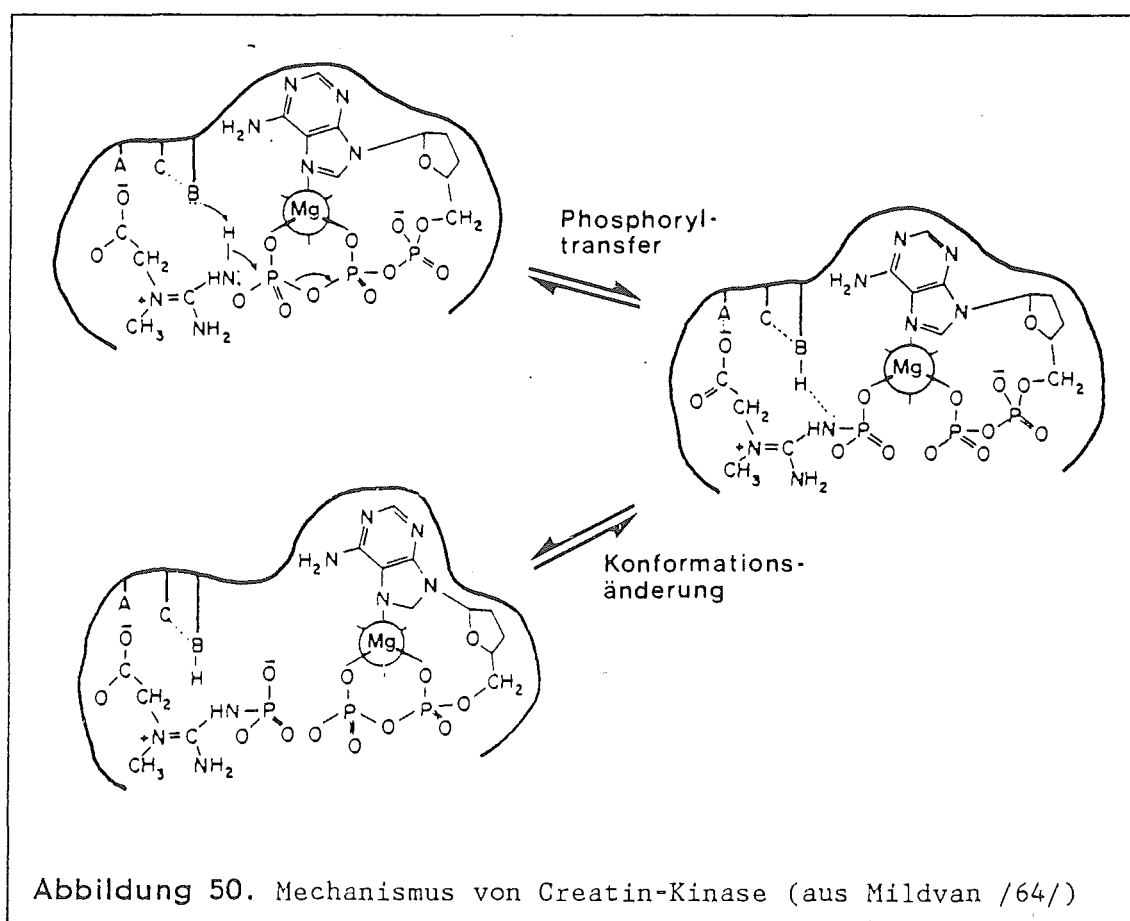
Die hohe Temperatur von 37°C bei den Versuchen zur γ -Glutamyl-Cystein-Synthese war ein wesentlicher Faktor bei der hohen Desaktivierungsrate. Da bei 25°C nur noch 29% der wenigen Units zur Verfügung gestanden hätten, wurde auf eine Herabsetzung der Temperatur verzichtet.

9.0 DISKUSSION

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse haben gezeigt, daß die an das Verfahren gestellten Erwartungen, wie sie zu Beginn des Kapitels 2 auf Seite 9 formuliert wurden, größtenteils erfüllt werden konnten. Es stellt sich bei Betrachtung der einzelnen Anforderungen heraus, daß sich die vorhandenen Probleme auf zwei Fragestellungen beschränken:

- Besitzt ein interessierendes Enzym zusammen mit einem PEG-Derivat ausreichende Aktivität ?
- Wenn genügend Aktivität vorhanden ist, reicht die Stabilität des Enzyms für die kontinuierliche Betriebsführung aus ?

Die in der Tabelle 8 (Seite 66) wiedergegebenen Ergebnisse haben gezeigt, daß es offenbar bei einigen Enzymen keine Möglichkeit gibt, sie mit polymergebundenem Coenzym im Enzymmembranreaktor einzusetzen. So



ist bei Pyruvat-Kinase auch von anderen Autoren keine Aktivität mit anderen Polymeren und Spacerstrukturen nachweisbar gewesen /49,72/. Die Ausbildung der korrekten Anordnung der Reaktanden im aktiven Zentrum scheint durch die Polymerbindung verhindert zu werden. Zur Illustrierung sei auf die Abbildung 50 hingewiesen. Das dort tief im Enzym eingebettete Coenzym wäre bei der Ausbildung der aktiven Konformation offensichtlich durch ein Polymer behindert. Eine Chance, ein Enzym aus einem anderen Organismus zu isolieren oder doch ein geeignetes Polymer-ATP zu synthetisieren, mag dennoch nicht aussichtslos sein. Bei einem solchen Enzym wäre ein anderer Mechanismus zu erwarten.

Das Problem betrifft in besonderer Weise das Enzym Adenylat-Kinase. Da es bislang mit keinem untersuchten ATP-Derivat arbeitet, ist die auf Seite 19 skizzierte Regenerierung von AMP nicht möglich. Die Prüfung von Phosphoenolpyruvat-Synthase (Reaktionsgleichung 8) und Pyruvat-Phosphatdikinase (Gleichung 9) auf ihre Verwendbarkeit steht noch aus. Dies hat zur Konsequenz, daß Synthesen mit dem beschriebenen Verfahren mit AMP als Produkt noch nicht durchführbar sind. Eine Reihe interessanter nichtribosomaler Peptidsynthesen /98/ fallen unter diese Einschränkung.

Beim Vergleich der verschiedenen ATP-Derivate in Tabelle 8 hat sich das PEG-ATP Derivat II bislang als das coenzymatisch aktivste erwiesen. Es fällt schwer, aus den Unterschieden der Spacerstruktur auf die gemessenen Aktivitäten zu schließen. Dies gilt um so mehr, wenn man die verschiedenen, bereits auf Seite 63 im Zusammenhang mit dem Molekulargewicht des Polymers diskutierten Probleme beim Vergleich einzelner Chargen berücksichtigt. Ordnet man die Derivate nach ihrer Verwendbarkeit an, ergibt sich $\text{PEG-ATP II} > \text{II}' > \text{IV} > \text{V} > \text{VI} > \text{III} > \text{I}$. Die N^6 -Derivate sind somit dem C^8 -Derivat überlegen. Um eine gute Aktivität zu erreichen, muß der Spacer offenbar eine gewisse Länge besitzen.

Zur ausreichenden Bewertung von PEG-ATP III sind noch weitere Aktivitätsmessungen nötig. Wenn bei einem einzelnen Enzym mit PEG-ATP II keine Aktivität gefunden werden konnte, haben bislang auch die übrigen Derivate versagt.

Unzureichende Enzymstabilität kann, wie die Versuche mit γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase gezeigt haben, der limitierende Faktor werden. Um die Produktivität des Reaktors aufrecht zu erhalten, werden hohe Nachdosierungen von (Enzym-)Protein notwendig. Die eine Art der Limitierung ist daher eine verfahrenstechnische. Das in Kapitel 3.1 angesprochene Phänomen der Konzentrationspolarisation bzw. allgemein die Löslichkeit der Proteine setzt hier den Grenzwert fest. Die zweite und letztlich entscheidene Limitierung ist durch die Frage nach der Wirtschaftlichkeit gegeben. Diese wird nicht nur durch das Verhältnis von Enzymkosten und Stabilität bestimmt. Ist die Grenze der Nachdosierbarkeit noch vor einer weitgehenden Desaktivierung des Coenzym erreicht,

geht unverbrauchtes ATP verloren oder muß rückgewonnen werden. Im vorliegenden Beispiel beträgt die Mindestbetriebszeit ca. 400-500 Stunden.

Die Verwendung von Hohlfasermembranen oder Thin-Channel-Systemen erlaubt durch eine günstige Kontrolle des Membranbelags durch parallel zur Membran verlaufende Strömung höhere Proteinkonzentration und somit längere Betriebszeiten als einfache gerührte Zellen. Erreicht der Reaktordruck den maximal zulässigen Grenzwert oder flockt das Protein aus, muß die Produktion abgebrochen oder die Verdünnungsrate herabgesetzt werden.

Die Betriebszeit kann durch die richtige Strategie der Enzymdosierung maximiert werden. Dazu ist immer die kleinstmögliche Enzymkonzentration, die für einen gegebenen Umsatz erforderlich ist, im Reaktor aufrecht zu erhalten. Bereits die Startkonzentration muß möglichst gering sein. Das Experiment zur kontinuierlichen Glucose-6-phosphat-Produktion im Thin-Channel-System war in diesem Sinne besser als das zweite durchgeführt, da nur geringe Enzymmengen nachgegeben wurden, wenn der Umsatz absank. Eine feinere Ausregelung ist leicht an Hand der Autoanalyzertextinktion durchführbar. Ein Beispiel für eine rechnergesteuerte Nachdosierung bei der Produktion von L-Aminosäuren im Enzymmembranreaktor gibt die Arbeit von Jandel /97/.

Allerdings kann aus dem Sinken des Umsatzes nur geschlossen werden, daß eine Limitierung vorliegt, aber nicht welches Enzym oder ob das Coenzym die Ursache ist. Erst mit einer Möglichkeit, das Verhältnis von ATP und ADP innerhalb des Reaktors zu messen, stünde ein Indikator zur Verfügung, bei sinkendem Umsatz entscheiden zu können, welches Enzym das limitierende ist. Leider ist diese Differenzierung des polymergebundenen Coenzym nicht möglich. Erst die Bestimmung der Einzelaktivitäten und der Summe von ATP und ADP, wie sie in dieser Arbeit vorgestellt wurde, kann Auskunft über die Ursachen geben. Mit ausreichender Konstanz der Desaktivierung kann eine Regelstrategie beschritten werden, bei der ein bestimmtes, angepaßtes Enzymverhältnis nachdosiert wird, noch bevor die Einzelergebnisse vorliegen.

Bei als feststehend angenommenen Enzymkosten kommen Bemühungen zur Stabilitätserhöhung größte Bedeutung zu. Prinzipiell stehen bei gelösten Enzymen drei Wege offen /34/:

- Screening nach stabileren Enzymen, z.B. bei thermophilen Organismen
- Zusatz von stabilisierenden Verbindungen, z.B. Polyole
- Chemische Modifizierung am Enzymprotein, z.B. Acylierung

Enzyme, welche aus in extremer Umwelt existierenden Mikroorganismen gewonnen werden, zeichnen sich durch teilweise außergewöhnliche Stabi-

lität aus. Nicht nur ihre Widerstandsfähigkeit gegen Temperatureinwirkung, sondern auch gegen schädigende Einflüsse extremer Ionenstärken oder pH-Werte macht sie als technische Katalysatoren interessant. Der Einsatz solcher Enzyme verspricht lange Standzeiten im kontinuierlichen Reaktorbetrieb. Die Stabilitätserhöhung sollte im vorliegenden Fall nicht zur Erhöhung der Temperatur ausgenutzt werden, da andernfalls die Hydrolyse des Acetylphosphats die Ausbeute senkt. Der Umstand, daß die spezifische Aktivität thermostabiler Enzyme bei 'normaler' Temperatur geringer als bei thermolabilen ist, bringt keine wesentlichen Nachteile mit sich, da nur geringe Nachdosierungen erforderlich sind.

Acetat-Kinasen aus thermophilen Mikroorganismen wie unter anderem aus *Thermus thermophilus* /99/, *Bacillus stearothermophilus* /45/ oder *Clostridium thermoaceticum* /100/ sind beschrieben worden. Eine seit kurzer Zeit käufliche Acetat-Kinase aus *Bacillus stearothermophilus* ist bereits auf ihre Akzeptanz gegenüber molekulargewichtsvergrößertem ADP getestet worden. Zur Bestimmung wurde der gleiche auf Seite 46 beschriebene kontinuierliche Test wie mit der Kinase aus *E. coli* durchgeführt. Die Messungen ergaben bei 25°C mit dem PEG-ATP II eine maximal erreichbaren Reaktionsgeschwindigkeit von 16 U/mg, verglichen mit dem nativem Coenzym ist dies eine Aktivität von 90%. Ohne bereits genauere kinetische Untersuchungen durchgeführt zu haben, dürfte die Michaelis-Menten-Konstante unter 0.5 mmol/l PEG-ADP liegen. Eine Überschußinhibition macht sich erst bei PEG-ADP-Konzentrationen über 2 mmol/l bemerkbar.

Die Ergebnisse deuten an, daß hier ein weitgehend ungenutztes Potential liegt. Bei der Suche nach interessanten Kinasen oder Synthetasen sollten daher die durchzuführenden Screenings entsprechend erweitert werden. Als Merkmal ist nicht nur eine hohe Stabilität gegen Temperatureinwirkung sondern auch gegenüber den anderen beschriebenen Einflüssen zu beachten. Von Interesse ist beispielsweise eine Unempfindlichkeit gegen Oxidation, nicht zuletzt um den Bedarf an Antioxidantien zu vermeiden.

Der Zusatz von stabilisierenden Verbindungen hat sich im vorliegenden Fall als unvermeidlich erwiesen. Die besondere Bedeutung von Thiolverbindungen liegt nicht nur in der Schutzfunktion vor Oxidation, sondern vor allem auf ihrer Fähigkeit zur Reaktivierung von oxidierten Schwefelgruppen des Enzyms. Auch wenn solche niedermolekularen Stoffe kontinuierlich mit den Substraten zugeführt werden und später bei der Produktaufarbeitung wieder abgetrennt werden müssen, sollte nicht darauf verzichtet werden. Maßnahmen zur Verringerung der Gelöstsauerstoffkonzentration wie Evakuierung der Lösungen oder Inertbegasung können die notwendige Menge erheblich reduzieren. Superoxid-Dismutase kann nur eine vorbeugende Wirkung durch Unterdrückung der Inaktivierung von O_2^- entfalten.

Die Superoxid-Dismutase scheint bei den Experimenten keine deutliche Verbesserung der Stabilität herbeizuführen. Die Tatsache, daß auch während des zweiten kontinuierlichen Produktionsversuchs die Desaktivierungsraten der Enzyme abnahmen und keine Superoxid-Dismutase zugegeben wurde, läßt nicht mehr den Schluß zu, daß beim ersten Versuch eine Wirkung der Superoxid-Dismutase vorlag. Die Überprüfung von Reaktorproben mit einem Nitroblautetrazolium-Test ergab eine starke Reduktion des Farbstoffs zum Formazan als Nachweis einer Radikalbildung⁵ /101/. Dies muß allerdings nicht unbedingt auf Sauerstoffradikale zurückzuführen sein. Auch wenn die Dismutase keinen hohen Beitrag zur Stabilisierung erbringen konnte, erscheint es wegen des allgemein bedeutsamen Wirkungsmechanismus lohnend, nähere Untersuchungen anzustellen. Im Einzelfall könnte ihr Beitrag von größerer Bedeutung sein.

Einen Teil der im Verlauf beider Experimente beobachteten Stabilisierung mag durch den steigenden Proteingehalt aus den Enzymnachdosierungen zu erklären sein.

Allgemein ist die Zugabe von Polymeren zur Stabilisierung für Enzymmembranreaktoren ungeeignet. Zusätze von Substanzen wie Polyvinylalkohol, Dextran, Polyethylenglycol oder Nichtenzymprotein erfüllen zwar ihren Zweck, müssen allerdings in Konzentrationen bis zu 1% eingesetzt werden. Die höhere Viskosität der Lösung und wachsende Probleme bei der Ultrafiltration lassen von ihrer Verwendung abraten. Allerdings befindet sich mit dem polymergebundenem Coenzym bereits ein Polymer in der Reaktorlösung. Die Verwendung von wenig aufgereinigten Enzymen mit niedriger spezifischer Aktivität wie bei den Experimenten zur γ -Glutamyl-Cystein-produktion führt in gleicher Weise zu erhöhter Stabilität. Auf die resultierenden Limitierungen wurde bereits mehrfach hingewiesen.

Eingriffe am Proteinmolekül sind seit längerer Zeit als potentes Mittel zur Erhöhung von Stabilität und Enzymaktivität bekannt (siehe dazu /34/). Als Beispiele seien die Quervernetzung zu Oligomeren und die Substituierung von Lysinresten des Proteins genannt. Die Wirkung der chemischen Modifizierung zielt auf die Verbesserung von Temperatur- und pH-Stabilität. Beim Einsatz in Membranreaktoren ist eine mögliche Änderung der Löslichkeit von Bedeutung.

Verfügt man über ein stabileres Enzym, ist noch das Problem der mechanischen Desaktivierung zu lösen. Ihre Verringerung ist in erster Linie eine konstruktive Aufgabe. Die Experimente mit dem Thin-Channel-Reaktor haben gezeigt, daß die Desaktivierungsrate von der Umpumpgeschwindigkeit

⁵ Die Messungen wurden freundlicherweise von Frau Dipl.-Biol. B. Meier, Institut für Biotechnologie 2 der KFA Jülich, durchgeführt.

abhängt. Die Kreislaufpumpe ist dabei für den überwiegenden Teil der mechanischen Desaktivierung verantwortlich zu machen /97/.

Die im Reaktorkreislauf eingebaute Zahnradpumpe sollte daher ersetzt werden. Den Anforderungen nach Sterilisierbarkeit und schonender Förderung kommen eine Reihe von Pumpentypen nach. Beispielsweise sind rotierende Verdrängerpumpen, wie sie unter anderem in der Lebensmittelindustrie eingeführt sind, geeignet. Zum Betrieb des in dieser Arbeit vorgestellten Reaktors bestand allerdings eine Limitierung seitens des möglichen Reaktorvolumens, da die Mengen an Substrat und PEG-ATP begrenzt waren. In Frage kommende Pumpen waren nicht im erforderlichen Maßstab erhältlich. Die verwendete Zahnradpumpe nahm bereits 2/3 des Gesamtvolumens in Anspruch. Schlauchpumpen sind nur bedingt eine Alternative, da die Lebensdauer eines Schlauchs geringer als die mögliche Betriebszeit ist. Ab einer bestimmten Reaktorgröße (ca. 250 ml) sind geeignete Pumpen verfügbar.

Die bisherigen Überlegungen haben die Grenzen des vorgestellten Verfahrens zur ATP-Regenerierung aufgezeigt. Hat man eine bestimmte Anwendung ins Auge gefaßt, wird wie folgt vorgegangen:

Screening und Enzymisolierung: Soweit es die ATP-Regenerierung im Enzymmembranreaktor betrifft, sind bereits in Zusammenhang mit den Erörterungen zu Enzymaktivität und Stabilität eine Reihe von Anmerkungen gemacht worden. Kurz zusammengefaßt muß bei der Auswahl einer Enzymquelle sowohl die Akzeptanz von PEG-ATP überprüft und eine - eventuell nach Treffen geeigneter Maßnahmen - hinreichende Stabilität sichergestellt werden.

Aufgrund der bisherigen Erfahrung ist es sinnvoll, als polymergebundenes ATP zuerst das PEG-ATP II zu testen. Als Polymer hat sich das Polyethylenglycol mit einem Molekulargewicht von 20000 bewährt. Es bietet bei der YMS-Membran eine ausreichende Retention und führt zu vertretbaren Viskositäten.

Kinetische Untersuchungen: Solange beim vorgestellten Verfahren die Acetat-Kinase aus *E. coli* nicht durch ein neues Enzym wie beispielsweise aus *B. stearothermophilus* ersetzt wird, gelten folgende Randbedingungen:

pH-Bereich	7 - 8.5		Magnesium	10 mmol/l
Temperatur	≤ 25°C		Dithiotreit	0.5 mmol/l

Weicht der als optimal ermittelte pH-Wert des Produktionsenzym erheblich von dem der Acetat-Kinase ab, muß ein Kompromiß gefunden werden. Allerdings ist in diesem Fall mit einer erhöhten Enzymdesaktivierung zu rechnen, da die pH-Optima für Stabilität und Aktivität in der Regel dicht beeinander liegen. Eine pH-Regelung des Reak-

tors kann den bei den bisherigen Experimenten verwendeten 0.2 molaren Trispuffer ersetzen. Das in erster Linie von der Acetatbildung aus Acetylphosphat bestimmte Volumen an Korrekturmittel muß bei der Einstellung der Verdünnungsrate berücksichtigt werden.

Die Temperatur sollte nicht wesentlich erhöht werden. Andernfalls muß, wie bereits oben erwähnt, ein stärkerer, durch Hydrolyse verursachter Verlust an Acetylphosphat in Kauf genommen werden (Aktivierungsenergie 117 kJ/mol /68/). Gleiches gilt für die Desaktivierungsrate der Enzyme, soweit sie nicht thermostabil sind.

Sind Substrate oder Produkte in der Lage, größere Teile Magnesium zu komplexieren, ist der Anteil an freien Ionen (rechnerisch) zu überprüfen und gegebenenfalls die Gesamtkonzentration von 10 mmol/l zu erhöhen.

Die Messung der Einflüsse von Substraten, Produkten und eventuellen Effektoren - hier sei an die Inhibierung der Hexokinase durch Acetylphosphat erinnert - bildet die Basis zur Formulierung eines kinetischen Modells und die Voraussetzung zur zielgerichteten Optimierung der Produktionsbedingungen. Es ist dabei zu überlegen, wie weit das mathematische Modell nur der Datenkorrelation dient oder eine funktionale Beschreibung der Enzymreaktion darstellt. Eine mehr oder weniger komplexe Beschreibung bietet sich vor allem dann an, wenn die Enzyme wie Acetat-Kinase und Hexokinase bereits gut in der Literatur charakterisiert sind.

Kontinuierliche Produktion: Die Ergebnisse der kinetischen Messungen zeigen zuallererst, ob ein Rührkessel der optimale Reaktor ist. Wenn die Beurteilung, wie sie in Kapitel 3.3 auf Seite 30 beschrieben wurde, nur in geringem Maß zu Gunsten von Strömungsrohr bzw. Kaskade ausfällt, bleibt der mit wenig Aufwand verbundene Rührkessel der Reaktor der Wahl.

Mit den in dieser Arbeit angegebenen Hilfsmitteln der Optimierverfahren und Simulationsrechnung (Seiten 67 und 89) lassen sich nun bei Kenntnis der Einzelkosten die wirtschaftlichsten Betriebspunkte abschätzen und in anschließenden Experimenten überprüfen.

Die vollständige Kostenrechnung wirft allerdings zur Zeit Probleme auf, da Angaben für PEG-ATP und Acetylphosphat nur geschätzt werden können. Der Kostenanteil des polymergebundenen Coenzym wird angesichts des erreichten Nutzungsgrades von nahezu 20000 Regenerierzyklen, also 20000 Mol erzeugtes Produkt pro Mol verbrauchtem ATP, vernachlässigbar gering. Als problematischer erweist sich, daß Acetylphosphat zur Zeit ausschließlich in teuren Klein-

packungen zu Laborzwecken angeboten wird. Solange nicht ein passender Anbieter gefunden werden kann, erscheint die eigene Synthese aus Phosphorsäure und Keten als einziger Ausweg /102/.

Aufbau und Scale-Up von Membranreaktoren sind unproblematisch, die Komponenten werden kommerziell in verschiedenen Ausführungen angeboten.

Die sich in Zukunft stellenden Aufgaben zur Fortsetzung der Arbeiten lassen sich in zwei Punkten zusammenfassen:

1. Verbesserung der Regenerierung
2. Neue Anwendungen

Die Verbesserung der Regenerierung zielt zum einen auf das Enzym und seine Stabilität sowie auf die verfahrenstechnischen Aspekte. Der Überprüfung neuer Enzyme kommt dabei besondere Bedeutung zu. Neben der angesprochenen thermostabilen Acetat-Kinase ist Polyphosphat-Kinase von großem Interesse. Auch wenn die Aktivität des Enzyms mit polymergebundenem ADP nur 10% der mit nativem Coenzym meßbaren Reaktionsgeschwindigkeit erreicht, eröffnet sich mit der Verwendung von Polyphosphat als dem mit Abstand stabilsten und billigsten Substrats eine Alternative. Die Wirtschaftlichkeit wird im wesentlichen von den Ergebnissen der Stabilitätsuntersuchungen abhängen.

Weitere Arbeiten sollten die Möglichkeit der AMP-Regenerierung verfolgen. Ihre Durchführbarkeit wäre ein erheblicher Fortschritt, da dann die Enzymklasse der Synthetasen vollständig erschlossen werden könnte und neue Wege zu hochwertigen Produkten eröffnet werden.

Verfahrenstechnische Verbesserungen sollen zu einer geringen, mechanischen Beanspruchung der Enzyme unter Erhaltung einer effektiven Ultrafiltration führen. Bei dem Thin-Channel-System wurde die Problematik der Kreislaufpumpe bei der Erörterung der Desaktivierung bereits angesprochen.

Die Arbeiten zur γ -Glutamyl-Cystein-Synthese sind nach weiteren Experimenten zur Steigerung der Enzymstabilität mit kontinuierlichen Produktionsversuchen weiterzuführen.

Als ein neues, mit polymergebundenem ATP arbeitendes Enzym wird in Kürze NAD-Kinase in ausreichender Menge zur Verfügung stehen, um es im Membranreaktor einsetzen zu können /103/. Mit der enzymatischen Produktion von NADP aus NAD steht damit neben der vorgestellten Dipeptidsynthese eine weitere Anwendung der ATP-Regenerierung zur Darstellung hochwertiger Biochemika zur Verfügung.

10.0 ZUSAMMENFASSUNG

Gegenstand der Arbeit ist es, das Prinzip des Enzymmembranreaktors auch für ATP verbrauchende Reaktionssysteme nutzbar zu machen. Durch die kovalente Bindung des Coenzym an ein lösliches Polymer wird seine Größe soweit angehoben, daß es zusammen mit den Enzymen mit einer Ultrafiltrationsmembran im Reaktor zurückgehalten wird.

Im einzelnen wurden die folgenden Ergebnisse erzielt:

- Es wurden insgesamt 6 verschiedene, polymergebundene ATP-Derivate auf ihre enzymatische Aktivität hin untersucht. Es zeigte sich eine erhebliche Abhängigkeit von der Art der Verbindung (Spacer) zwischen Polymer und ATP. Ein N⁶-Derivat, über eine Aminohexylgruppe an Polyethylenglycol gekoppelt, zeigte in allen Fällen die höchste Aktivität.
- Die Verwendung von polymergebundenem ATP erwies sich in einzelnen Fällen als problematisch. Eine Reihe von überprüften Enzymen besitzen keine Aktivität.
- Von den zur Regenerierung von ADP geeigneten Phosphotransferasen bietet Acetat-Kinase mit polymergebundenem Coenzym die höchste Aktivität.
- Hexokinase wurde als erstes Enzym für eine kontinuierliche Synthese ausgewählt. Sie zeigte gegenüber polymergebundenem ATP eine höhere Aktivität als mit nativem ATP.
- Die kinetischen Eigenschaften von Acetat-Kinase und Hexokinase bei Verwendung von polymergebundenem Coenzym wurden experimentell ermittelt und in einem kinetischen Modell zusammengefaßt. Aus Kenntnis der Enzymkinetik konnten durch Lösen der Massenbilanzen der beteiligten Reaktanden Arbeitspunkte für die kontinuierliche Reaktionsführung der Glucose-6-phosphat-Produktion errechnet werden.
- Die Stabilität der Enzyme konnte durch den Zusatz von Dithiothreitol deutlich erhöht werden.
- Zu den kontinuierlichen Produktionsversuchen wurden sowohl eine gerührte Zelle als auch ein Thin-Channel-Apparat als Membranreaktoren eingesetzt. Die Kreislaufpumpe des Thin-Channel-Systems machte sich durch zusätzliche Enzymdesaktivierung bemerkbar.

- Zur Prozeßkontrolle wurde der Umsatz mittels einer kontinuierlichen Analyseneinheit verfolgt. Enzym- und Coenzymgehalt des Reaktors wurden in entnommenen Proben bestimmt.
- Die Glucose-6-phosphat-Produktion wurde einen Monat lang mit einem mittleren Umsatz von 80% betrieben. Die durchschnittliche Produktivität betrug 348 g/ld bei einem spezifischen Enzymverbrauch von 3.4 U/g für Hexokinase und Acetat-Kinase. Das Coenzym wurde nahezu 20000fach regeneriert.
- Mit der Produktion von γ -Glutamyl-Cystein wurde eine weitere Anwendung aufgezeigt.

Die Ergebnisse der Arbeit haben gezeigt, daß sich das Konzept des Enzym-membranreaktors mit polymergebundenem ATP auf eine Reihe von enzymatischen, ATP abhängigen Synthesen anwenden läßt.

A.0 ERGÄNZENDE ANGABEN ZU ANALYTISCHEN METHODEN

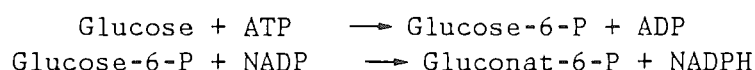
A.1 TESTANSÄTZE ZUR BESTIMMUNG VON ENZYMAKTIVITÄTEN

Im folgenden Abschnitt sind die verwendeten Konzentrationen, wie sie in der Küvette vorliegen, aufgeführt. Falls nicht anders angegeben, wurde die Aktivität der folgenden Enzyme unter folgenden Bedingungen bestimmt:

Temperatur	25 °C
Trispuffer, pH 7.6	200 mmol/l
MgCl ₂	10 mmol/l

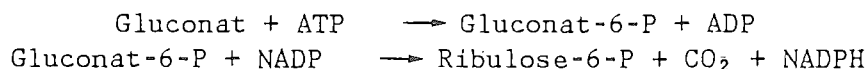
Alle photometrischen Tests nutzen eine NAD(H) bzw. NADP(H) abhängige Dehydrogenase für die Indikatorreaktion. Ausgewertet wird die Extinktionsänderung bei 340 nm ($\epsilon = 6.22 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$, Schichtdicke 1 cm). Eine Enzymeinheit (U) ist definiert als 1 μmol umgesetzten Substrat bzw. gebildeten Produkts pro Minute unter den angegebenen Bedingungen (= 16.67 nkat).

Hexokinase, EC 2.7.1.1



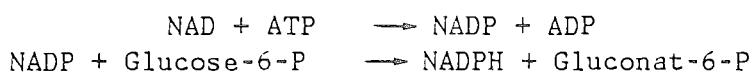
Glucose	35 mmol/l
NADP	0.8 mmol/l
(Polymer-)ATP	(0.5, 1.0) 1.5 mmol/l
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH)	0.9 U/ml
Hexokinase (HK)	30 mU/ml

Gluconat-Kinase, EC 2.7.1.12



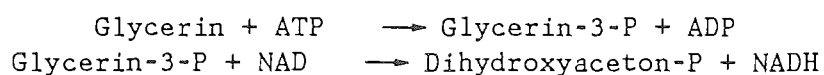
Gluconat	0.3 mmol/l
NADP	0.8 mmol/l
(Polymer-)ATP	(0.5, 1.0) 1.5 mmol/l
6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (6-PGDH)	0.9 U/ml
Gluconat-Kinase (G-K)	30 mU/ml

NAD-Kinase, EC 2.7.1.23



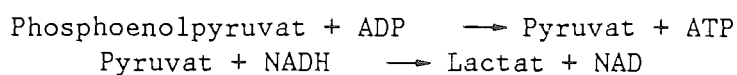
Glucose-6-phosphat	35 mmol/l
NAD	3.0 mmol/l
Dithiothreitol	2.0 mmol/l
(Polymer-)ATP	(0.5, 1.0) 1.5 mmol/l
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH)	1.0 U/ml
NAD-Kinase (NAD-K)	10 mU/ml

Glycerokinase, EC 2.7.1.30



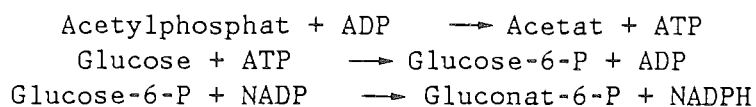
Glycerin	3.0 mmol/l
NAD	0.9 mmol/l
(Polymer-)ATP	(0.5, 1.0) 1.5 mmol/l
Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (GDH)	1.0 U/ml
Glycerokinase (GK)	30 mU/ml

Pyruvat-Kinase, EC 2.7.1.40



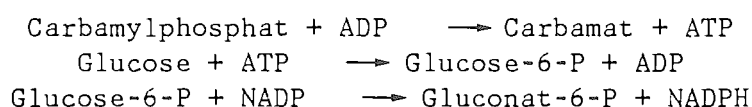
Phosphoenolpyruvat	5.0 mmol/l
KCl	10 mmol/l
NADH	0.2 mmol/l
(Polymer-)ADP	(0.5, 1.0) 1.5 mmol/l
Lactat-Dehydrogenase (LDH)	10 U/ml
Pyruvat-Kinase (PK)	30 mU/ml

Acetat-Kinase, EC 2.7.2.1



Acetylphosphat	35 mmol/l
Glucose	35 mmol/l
Dithiothreitol	2.0 mmol/l
NADP	0.8 mmol/l
(Polymer-)ADP	(0.5, 1.0) 1.5 mmol/l
Hexokinase (HK)	2.8 U/ml
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH)	1.1 U/ml
Acetat-Kinase (AK)	30 mU/ml

Carbamat-Kinase, EC 2.7.2.2



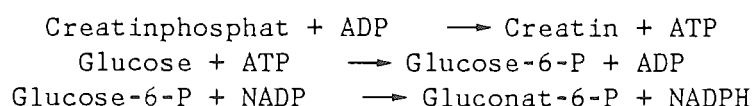
Carbamylphosphat	10 mmol/l
Glucose	10 mmol/l
NADP	0.8 mmol/l
(Polymer-)ADP	(0.5, 1.0) 1.5 mmol/l
Hexokinase (HK)	2.8 U/ml
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH)	1.1 U/ml
Carbamat-Kinase (CAK)	30 mU/ml

3-Phosphoglycerat-Kinase, EC 2.7.2.3



Glycerat-3-phosphat	6.5 mmol/l
NADH	0.2 mmol/l
(Polymer-)ATP	(0.5, 1.0) 1.5 mmol/l
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	1.1 U/ml
3-Phosphoglycerat-Kinase (PGK)	30 mU/ml

Creatin-Kinase, EC 2.7.3.2



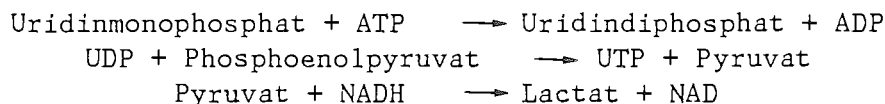
Creatinphosphat	35 mmol/l
Glucose	35 mmol/l
NADP	0.8 mmol/l
Dithiothreitol	2.0 mmol/l
(Polymer-)ADP	(0.5, 1.0) 1.5 mmol/l
Hexokinase (HK)	2.8 U/ml
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH)	1.1 U/ml
Creatin-Kinase (CK)	30 mU/ml

Adenylat-Kinase (Myokinase), EC 2.7.4.3

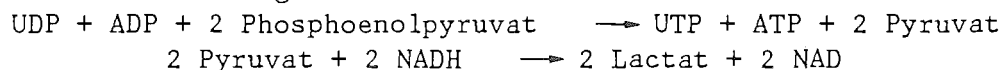


Glucose	35 mmol/l
NADP	0.8 mmol/l
(Polymer-)ADP	(0.5, 1.0) 1.5 mmol/l
Hexokinase (HK)	2.8 U/ml
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH)	1.1 U/ml
Adenylat-Kinase (MK)	30 mU/ml

Nucleosidmonophosphat-Kinase, EC 2.7.4.4

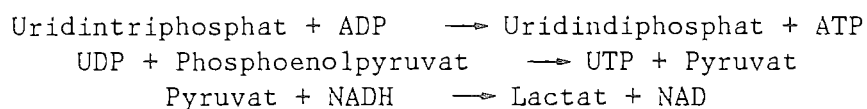


Bei nativem ATP reagiert zusätzlich ADP ab:



Uridinmonophosphat	0.8 mmol/l
Phosphoenolpyruvat	2.0 mmol/l
MgCl ₂	20 mmol/l
KCl	80 mmol/l
NADH	0.2 mmol/l
(Polymer-)ADP	(0.5, 1.0) 1.5 mmol/l
Lactat-Dehydrogenase (LDH)	22 U/ml
Pyruvat-Kinase (PK)	8 U/ml
Nucleosidmonophosphat-Kinase (NMPK)	30 mU/ml

Nucleosiddiphosphat-Kinase, EC 2.7.4.6



Da natives ADP mit Pyruvatkinase reagiert, kann nur Polymer-ATP gemessen werden.

Uridintriphosphat	1.0 mmol/l
Phosphoenolpyruvat	0.8 mmol/l
MgCl ₂	17 mmol/l
KCl	67 mmol/l
NADH	0.2 mmol/l
Polymer-ADP	(0.5, 1.0) 1.5 mmol/l
Lactat-Dehydrogenase (LDH)	4.0 U/ml
Pyruvat-Kinase (PK)	0.5 U/ml
Nucleosiddiphosphat-Kinase (NDPK)	30 mU/ml

γ-Glutamyl-Cystein-Synthetase, EC 6.3.2.2

Die Aktivitätstests wurden von Denda als Batch-Versuche ausgeführt. Die zeitliche Zunahme des Dipeptids wurde aus in Abständen entnommenen Proben mittels HPLC bestimmt /66/.

A.2 TESTANSÄTZE ZU KINETIK- UND STABILITÄTSUNTERSUCHUNGEN

Zusammensetzung von Standproben

Die Lösung entspricht einem Umsatz von 70%.

Trispuffer, pH 7.6	200 mmol/l
Acetylphosphat	18 mmol/l
Glucose	18 mmol/l
Glucose-6-phosphat	42 mmol/l
Acetat	42 mmol/l
MgCl ₂	10 mmol/l
Polymer-ADP (-ATP)	1.0 mmol/l

Je nach Versuch sind zusätzlich enthalten:

Dithiothreit	2 mmol/l
--------------	----------

Superoxid-Dismutase	30 mg/ℓ
Katalase	2000 U/mℓ
Rinderserumalbumin	1.5 mg/mℓ

Die Enzyme wurden getrennt untersucht

Hexokinase (HK)	3 U/mℓ
Acetat-Kinase (AK)	3 U/mℓ

Meßbedingungen zur Ermittlung des Temperatureinflusses

Der Testansatz entspricht weitgehend dem auf Seite 116 angegebenen. Es ist lediglich die Konzentration des natives ADP zur Messung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit geändert und die des Magnesiumchlorid angepaßt worden.

ADP	10 mmol/ℓ
MgCl ₂	20 mmol/ℓ

Meßbedingungen zur Ermittlung des pH-Einflusses

Der Test wird als Batch-Test durchgeführt. Zur Art der Probenahme sei auf die Beschreibung im Kapitel 5.2.2 verwiesen. Der pH-Wert wurde durch Mischen von 200 mM di-Kaliumhydrogen- und Kaliumdihydrogenphosphat-lösungen eingestellt.

Phosphatpuffer, pH 4 - 9	200 mmol/ℓ
Acetylphosphat	35 mmol/ℓ
MgCl ₂	20 mmol/ℓ
Dithiothreit	2.0 mmol/ℓ
ADP	10 mmol/ℓ
Acetat-Kinase (AK)	0.2 U/mℓ

Meßbedingungen zur Ermittlung des Einflusses von Acetylphosphat

wie vor mit

Trispuffer, pH 7.6	200 mmol/ℓ
------------------------------	------------

A.3 BESTIMMUNG VON ATP UND ADP

ATP-Bestimmung mit HK/G6P-DH

In der Küvette (d = 1 cm, 1.5 ml) befinden sich

Trispuffer, pH 7.6	200 mmol/l
Glucose	50 mmol/l
MgCl ₂	10 mmol/l
NAD(P)	1.0 mmol/l
(Polymer-)ATP	max. 0.3 mmol/l
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH)	0.9 U/ml
Hexokinase (HK)	1.5 U/ml

Messung des entstehenden NADH bei 25°C, 340 nm ($\epsilon = 6.22 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$)

ADP-Bestimmung

Das ADP wird zuerst mit Acetatkinase phosphoryliert, der Ansatz sollte einige Stunden ausreagieren.

Trispuffer, pH 7.6	200 mmol/l
Acetylphosphat	30 mmol/l
MgCl ₂	10 mmol/l
Acetat-Kinase	0.17 U/ml
Dithiothreitol	2.0 mmol/l
(Polymer-)ADP	max. 0.5 mmol/l

Die Acetat-Kinase wird mit 2 n HCl abgestoppt und der Ansatz nach ca. 10 min wieder neutralisiert. Die Lösung wird nun mit obigem Test auf ihren ATP-Gehalt überprüft. Unter Berücksichtigung der zusätzlichen Verdünnung ergibt die Differenz der Messungen die ADP-Konzentration.

A.4 NACHWEIS DER EINZELAKTIVITÄTEN IN REAKTORPROBEN

Hexokinase

Vor Zugabe in die Küvette wird die Reaktorprobe mit Hydroxylamin (200 mmol/l, pH 7.6) 1:5 verdünnt. Der Test in der Küvette enthält:

Trispuffer, pH 7.6	200 mmol/l
--------------------	------------

Glucose	50 mmol/l
Phosphoenolpyruvat	1.0 mmol/l
MgCl ₂	10 mmol/l
KCl	10 mmol/l
NADH	0.2 mmol/l
Lactat-Dehydrogenase (LDH)	8.0 U/ml
Pyruvat-Kinase (PK)	4.0 U/ml
ATP	2.0 mmol/l

Acetat-Kinase

Vor Zugabe in die Küvette wird die Reaktorprobe mit einer Lösung von Glucose-Oxidase und Katalase (3 U/ml GOD, 300 U/ml Kat) 1:25 verdünnt und mindestens 1 h stehengelassen. Der Test in der Küvette enthält:

Trispuffer, pH 7.6	200 mmol/l
Acetylphosphat	5.0 mmol/l
MgCl ₂	10 mmol/l
Glycerat-3-phosphat	6.5 mmol/l
NADH	0.2 mmol/l
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	2.4 U/ml
3-Phosphoglycerat-Kinase (PGK)	2.6 U/ml
ADP	3.0 mmol/l

A.5 LÖSUNGEN FÜR DEN AUTOANALYZERBETRIEB

Trispuffer, pH 7.6	50 mmol/l
Natriumazid	0.2 g/l
Brij®-35	0.6 g/l
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, L. mes.	3.2 U/ml
NAD	3.8 mmol/l

Alle Lösungen werden mit Puffer angesetzt und gekühlt aufbewahrt.

B.0 BERECHNUNG VON MODELLPARAMETERN

An dieser Stelle soll erläutert werden, wie die in der Tabelle 11 angegebenen Parameter aus den gemessenen Daten gewonnen wurden. Die Michaelis-Menten-Konstanten K_{mA} und K_{mB} folgten direkt aus der Parameteridentifizierung der kinetischen Messungen. Dagegen sind die Konstanten des ersten Reaktionsschrittes K_{ia} und K_{ib} nicht mit den vorgenommenen Messungen bestimmbar und wurden daher der Literatur entnommen. Andere Konstanten können nicht verwendet werden, da solche immer eine Enzymbindung mit (polymergebundenem) Coenzym beschreiben.

Am Beispiel der Acetat-Kinase wird die Rechnungsweise für eine Substratüberschußinhibierung gezeigt. Es sind folgende Voraussetzungen getroffen worden:

1. Die gemessenen Reaktionsraten wurden als Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten bestimmt. Damit sind die Produktkonzentrationen $[P]$ und $[Q]$ als 0 einzusetzen.
2. Die Beträge der maximale Reaktionsgeschwindigkeit von Hin- und Rückreaktion unterscheiden sich nur unwesentlich. Aus der Haldane-Gleichung (Gleichung 20) ergibt sich $K_{ia} K_{mB} = K_{ib} K_{mA}$.
3. Das Enzym ist bei der Messung mit dem zweiten Substrat gesättigt. Im Beispiel wird die Inhibierung durch Substrat A (PEG-ADP) vorgestellt. Die Konzentration des Substrats B (Acetylphosphat) betrug mit 35 mmol/l. Der Quotient aus Substratkonzentration und der Michaelis-Menten-Konstante (0.43 mmol/l) ist damit vernachlässigbar klein.

Aus Gleichung 37 ergibt sich mit der ersten Voraussetzung und nach einer Division durch den Ausdruck $[B]/(K_{ia} K_{mB})$:

$$V = \frac{V_{\max} [A]}{\frac{K_{ia} K_{mB}}{[B]} + \frac{K_{mB} [A]}{[B]} + K + \frac{K_{mB} [A]^2}{K_{jA} [B]} + [A]} \quad (a)$$

Nach Einsetzen der Voraussetzung 2 und Zusammenfassung von Termen erreicht man eine der Gleichung 23 entsprechende Form:

$$V = \frac{V_{\max} [A]}{K_{mA} \left(1 + \frac{K_{ib}}{[B]}\right) + [A] \left(1 + \frac{K_{mB}}{[B]}\right) + [A]^2 / \left(\frac{K_{jA} [B]}{K_{mB}}\right)} \quad (b)$$

Mit Voraussetzung 3 reduzieren sich die ersten beiden Terme auf die Michaelis-Menten-Konstante und die Substratkonzentration von A. Der gesuchte Parameter K_{jA} folgt nun in Kenntnis der Substratkonzentration von

B und seiner Michaelis-Menten-Konstante unmittelbar durch Vergleich der Faktoren in Gleichung 23 und b:

$$K_i \text{ (Messung)} = \frac{K_{iA} [B]}{K_{mB}} \quad (c)$$

Aus dem gemessenen Wert für die Inhibierung (1.01 mmol/l) berechnet sich die gesuchte Konstante zu 0.0124 mmol/l.

Der Rechnungsgang zur Ermittlung der anderen Parametern bleibt exakt der gleiche. Als einzige weitere Formel wird Gleichung 22 für Produktinhibierung und kompetitive Inhibierung herangezogen.

C.0 GERÄTE- UND CHEMIKALIENLISTE

C.1 LISTE DER VERWENDETEN GERÄTE

Dosierung:

HPLC-Pumpe 2150 LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
Kältethermostat RC-3C MGW Lauda Wobster KG, Lauda-Königshofen
Blasenfalle, Septum Eigenbau, Werkstätten der KFA, Jülich
Sterilfilter SM16527 Sartorius GmbH, Göttingen
Absolutdruckaufnehmer 4043A5 mit Meßverstärker
Typ 4601 Kistler Instrumente GmbH, Ostfildern-Nellingen

Analyzer:

Cenco Vielkanalpumpe mit Bläseninjektor,
Kleinteile Kontron Analytik GmbH, Eching
Pye Unicam Spektalphotometer SP6-500 UV Philips GmbH, Kassel
Prozeßbrechner PDP-11/34 mit LPA11-K
Betriebssystem RSX-11M/V4.1 Digital Equipment Corp, München
Schreiber LS45 Linseis GmbH, Selb

Reaktoren:

Rührzelle, Thin-Channel-System und
Kunststoffteile Eigenbau, Werkstätten der KFA, Jülich
Thermostat C-3 MGW Lauda Wobster KG, Lauda-Königshofen
Kreislaufpumpe (Thin-Channel-Reaktor):
Zahnradpumpe Typ 114TY Verder, Düsseldorf

C.2 LISTE DER VERWENDETEN CHEMIKALIEN

Acetat-Kinase (aus <i>E. coli</i>)	Boehringer, Mannheim
(aus <i>B. stearothermophilus</i>)	Sigma, München
Acetylphosphat	Boehringer, Mannheim
Adenylat-Kinase	Sigma, München
ATP	Merck, Darmstadt
ADP	Boehringer, Mannheim
Brij®-35	Merck, Darmstadt
Carbamat-Kinase	Sigma, München
Carbamylphosphat	Sigma, München
Creatin-Kinase	Boehringer, Mannheim
Creatinphosphat	Sigma, München
1,4-Dithiothreitol	Merck, Darmstadt
Gluconat-Kinase	Boehringer, Mannheim
Glucose	Merck, Darmstadt
Glucose-Oxidase	Boehringer, Mannheim
Glucose-6-phosphat	Boehringer, Mannheim
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (aus Hefe) .	Boehringer, Mannheim
(aus <i>L. mesenteroides</i>)	Boehringer, Mannheim
Glycerat-3-phosphat	Boehringer, Mannheim
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase	Boehringer, Mannheim
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase . . .	Boehringer, Mannheim
Glycerokinase	Boehringer, Mannheim
Hexokinase	Boehringer, Mannheim
Hexokinase (in Agarose immobilisiert)	Sigma, München
Hydroxylammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumgluconat	Sigma, München
di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Katalase	Boehringer, Mannheim
Lactat-Dehydrogenase	Boehringer, Mannheim
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Nucleosidmonophosphat-Kinase	Boehringer, Mannheim
NAD	Merck, Darmstadt
NADH	Boehringer, Mannheim
NAD-Kinase	Sigma, München
NADP	Boehringer, Mannheim
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Boehringer, Mannheim
Phosphoenolpyruvat	Boehringer, Mannheim
3-Phosphoglycerat-Kinase	Boehringer, Mannheim
Polymer-ATP	M. Morr,
	GBF Braunschweig
Pyruvat-Kinase	Boehringer, Mannheim

Rinderserumalbumin	Boehringer, Mannheim
Superoxid-Dismutase	B. Meier, IBT Jülich
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Merck, Darmstadt
Uridinmonophosphat	Boehringer, Mannheim
Uridintriphosphat	Boehringer, Mannheim

1. S.S Wang, C.-K. King: *The Use of Coenzymes in Biochemical Reaktors* in T.K. Ghose, A. Fiechter, N. Blakebrough: *Advances in Biochemical Engineering*, Vol. 12, 119-146, Springer, Berlin (1979)
2. A.M. Klibanov, B. Cambou: *Unusal Catalytic Properties of Usual Enzymes*
International Conference on Enzyme Engineering VII, White Haven, Pennsylvania, USA, 25-30 September 1983
3. N. Miwa: *Glutathione*
Japan Kokai 76, 144, 789
4. D.I.C. Wang, J. Stramondo, R. Fleischaker: *Exploitation of Multienzyme Systems for Synthesis*
in Z. Bonak, N. Sharon, eds., *Biotechnological Applications of Proteins and Enzymes*, 183-201, Academic Press, New York (1977)
5. B.K. Hamilton, J.P. Montgomery, D.I.C. Wang: *Enzyme Reactions for Preparative Scale Synthesis*
in E.K. Pye, L.B. Wingard, eds., *Enzyme Engineering*, Vol. 2, 153-159, Plenum Press, New York (1975)
6. J.G. Stramondo, B.A. Solomon, C.K. Colton, D.I.C. Wang: *ATP Utilization During Gramicidin S Synthesis*
Food, Pharmaceutical and Bioengineering 1976/77, AIChE Symposium Series 172, Vol. 74, 1-7 (1978)
7. G.C. Avgerinos: *Hollow Fiber Reactor Design for Gramicidin S Synthetase with Enzymatic ATP Regeneration*
M.S. Thesis, Mass. Inst. Technol., Cambridge (1978)
8. A. Pollak, R.L. Baughn, G.M. Whitesides: *Large-Scale Enzymatic Synthesis with Cofactor Regeneration: Glucose 6-Phosphate*
J. Am. Chem. Soc., 99 (7), 2366-2367 (1977)
9. K. Sakata, H. Kitano, N. Ise: *Continuous ATP Production by Enzymes or Yeast Immobilized in Amphoteric Gels*
J. Appl. Biochem., 3 (6), 518-525 (1981)
10. O. Miyawaki, K. Nakamura, T. Yano: *Dynamic ATP Recycling for Continuous NADP Produktion*
Agric. Biol. Chem., 46 (11), 2725-2733 (1982)

11. R. Wichmann, C. Wandrey, A.F. Bückmann, M.-R. Kula: *Continuous Enzymatic Transformation in an Enzyme-Membrane-Reactor with Simultaneous NAD(H)-Regeneration*
Biotechnol. Bioeng., 23, 2789-2802 (1981)
12. H.G. Khorana: *Some Recent Developments in the Chemistry of Phosphate Esters of Biological Interest*
Wiley, New York (1961)
13. R.S. Langer, B.K. Hamilton, C.R. Gardner, M.C. Archer, C.K. Colton: *Enzymatic Regeneration of ATP. I. Alternative Routes*
AIChE J., 22 (6), 1079-1090 (1976)
14. I-Ji Fan, Y.C. Chien, I.H. Chiang: *The Inorganic Photoreduction of NADP to NADPH and Photophosphorylation of ADP to ATP in Visible Light*
Scientia Sinica, 21 (5), 663-668 (1978)
15. L.B. Wingard, S.J. Yao, C.C. Liu: *Electrochemical Generation of ATP: A Suggested Experimental Approach*
J. Mol. Catalysis, 8, 475-478 (1980)
16. Y. Ado, Y. Suzuki, T. Tadokoro, K. Kimura, H. Samejima: *Regeneration of ATP by Immobilized Microbial Cells and its Utilization for the Synthesis of ATP and CDP-Choline*
J. Solid-Phase Biochem., 4 (1), 43-55 (1979)
17. Y. Ado, K. Kimura, H. Samejima: *Production of Useful Nucleotides with Immobilized Microbial Cells*
in H.H. Weetall, G.P. Royer, eds., *Enzyme Engineering*, Vol. 5, 295-304, Plenum Press, New York (1980)
18. M. Asada, K. Yanamoto, K. Nakanishi, R. Matsuno, A. Kimura, T. Kamikubo: *Long Term Continuous ATP Regeneration by Enzymes of the Alcohol Fermentation Pathway and Kinases of Yeast*
Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 12 (4), 198-204 (1981)
19. A. Kimura, Y. Tatsutomi, R. Matsuno, A. Tanaka, H. Fukuda: *Some Properties of an Immobilized Glycolysis System of Yeast in Fermentative Phosphorylation of Nucleotides*
Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 11, 78-80 (1981)
20. K. Murata, K. Tani, J. Kato, I. Chibata: *Glycolytic Pathway as an ATP Generation System and its Application to the Production of Glutathione and NADP*
Enzyme Microb. Technol., 3 (7), 233-242 (1981)

21. K. Murata, K. Tani, J. Kato, I. Chibata: *Glutathione Production by Immobilized Saccharomyces cerevisiae Cells Containing an ATP Regeneration System*
Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 11 (2), 72-77 (1981)
22. H. Samejima, K. Kimura, Y. Ado, Y. Suzuki, T. Tomadokoro: *Regeneration of ATP by Immobilized Microbial Cells and its Utilization for the Synthesis of Nucleotides*
in G. Broun, G. Manecke, L.B. Wingard, eds.,: , *Enzyme Engineering* Vol. 4, 237-244, Plenum Press, New York (1978)
23. A. Tanaka, J. Hironaka: *Studies on Enzymatic Production of ATP*
Agr. Biol. Chem., 36 (5), 867-869 (1972)
24. M. Asada, K. Nakanishi, R. Matsuno, Y. Kariya, A. Kimura, T. Kamikubo: *Continuous ATP Regeneration Utilizing Glycolysis and Kinase Systems of Yeast*
Agric. Biol. Chem., 42 (8), 1533-1538 (1978)
25. K. Murata, K. Tani, J. Kato, I. Chibata: *Glutathione Production Coupled with an ATP Regeneration System*
Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 10 (1-2), 11-21 (1980)
26. Y. Sawa, K. Kanayama, H. Ochiai: *Photosynthetic Regeneration of ATP using a Strain of Thermophilic Blue-Green Algae*
Biotechnol. Bioeng., 14 (2), 305-315 (1982)
27. B. Arcles, N.S. Brinigar: *Respiratory Properties of Rat Liver Mitochondria Immobilized on an Alkylsilylated Glass Surface*
J. Biol. Chem., 250, 8856-8862 (1975)
28. M.F. Cocquempot, V. Larreta Garde, D. Thomas: *Stabilisation of Biological Photosystems: Immobilization of Thylakoids and Chromatophores for Hydrogen Production and ATP Regeneration*
Biochimie, 62 (8-9), 615-621 (1980)
29. V. Larreta Garde, G. Gellf, D. Thomas: *Immobilized Chromatophores - ATP Regeneration in Batch and Open Reactors*
Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 14 (4), 232-236 (1982)
30. V. Larreta Garde, M.F. Cocquempot, J.N. Barbotin, B. Thomasset, D. Thomas: *Immobilized Thylakoids and Chromatophores: Hydrogen Production and ATP Regeneration*
in H.H. Weetall, G.P. Royer, eds., *Enzyme Engineering*, Vol. 5, 109-118, Plenum Press, New York (1980)
31. G.W. Pace, H.S. Yang, S.R. Tannenbaum, M.C. Archer: *Photosynthetic Regeneration of ATP Using Bacterial Chromatophores*

- Biotechnol. Bioeng., 18 (10), 1413-1423 (1976)
32. A.-L. Smeds, A. Veide, S.-O. Enfors: *Regeneration of ATP by Chromatophores in Aqueous Two-Phase Systems*
Enzyme Microb. Technol., 5 (1), 33-36 (1983)
 33. H.S. Yang, K. Leung, C.A. Archer: *Preparation and Properties of Bacterial Chromatophores Entrapped in Polyacrylamide*
Biotechnol. Bioeng., 18, 1425-1432 (1976)
 34. R.D. Schmid: *Stabilized Soluble Enzymes*
in T.K. Ghose, A. Fiechter, N. Blakebrough, *Advances in Biochemical Engineering*, Vol. 12, 41-118, Springer, Berlin (1979)
 35. R.L. Baughn, O. Adalsteinson, G.M. Whitesides: *Large-Scale Enzyme Catalyzed Synthesis of ATP from Adenosine and Acetyl Phosphate. Regeneration of ATP from AMP*
J. Am. Chem. Soc., 100 (1), 304-306 (1978)
 36. C.K. Colton, M.I. Nemet, R.Y.K. Yang: *A Coupled Enzyme System for ATP Regeneration Immobilized in Magnetic Polyacrylamide Beads*
Food, Pharmaceutical and Bioengineering 1976/77, AIChE Symposium Series 172, Vol. 74, 8-13 (1978)
 37. Y.-S. Shih, G.M. Whitesides: *Large-Scale ATP-Requiring Enzymatic Phosphorylation of Creatine Can be Driven by Enzymatic ATP Regeneration*
J. Org. Chem., 42 (25), 4165-4166 (1977)
 38. G.M. Whitesides: *Organic Synthesis Using Cofactor Requiring Enzymes*
in J.P. Danehy, B. Wolnak, eds., *Enzymes: The Interface between Technology and Economics*, 17-24, Decker, New York (1980)
 39. G.M. Whitesides, A. Lamotte, O. Adalsteinson, C.K. Colton: *Covalent Immobilization of Adenylate Kinase and Acetate Kinase in a Polyacrylamide Gel: Enzymes for ATP Regeneration*
in S.P. Colowick and N.O. Kaplan, eds., *Methods in Enzymology*, Vol. 44, 887-897, Academic Press, New York (1976)
 40. G.M. Whitesides, A. Chmurny, P. Garrett, A. Lamotte, C.K. Colton: *Enzymatic Regeneration of ATP from AMP and ADP: Part II. Enzyme Immobilization and Reactor Development*
in E.K. Pye, L.B. Wingard, eds., *Enzyme Engineering*, Vol. 2, 217-222, Plenum Press, New York (1975)
 41. O. Zaborsky: *Immobilized Enzymes*
CRC Press, Cleveland, Ohio (1975)

42. J. Campbell, T.M.S. Chang: *Enzymatic Recycling of Coenzymes by a Multi-Enzyme System Immobilized within Semipermeable Collodion Microcapsules*
Biochim. Biophys. Acta, 397, 101-109 (1975)
43. M. Asada, K. Yanamoto, K. Nakanishi, R. Matsuno, A. Kimura, T. Kamikubo: *Long Term Continuous ATP Regeneration by Enzymes of the Alcohol Fermentation Pathway and Kinases of Yeast*
Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 12 (4), 198-204 (1981)
44. T.M.S. Chang, N. Kuntarian: *Galactose Conversion Using a Multienzyme Cofactor Recycling System*
in G. Broun, G. Manecke, L.B. Wingard, eds., *Enzyme Engineering*, Vol. 4, 193-197, Plenum Press, New York (1978)
45. I. Kazutomo, Rikagaku, Unitaka: *Process for Producing Physiologically Active Substance by Multienzyme Process and Apparatus for the Same*
Patent, EP 0 084 975 A2 (1983)
46. R.P. Chambers, E.M. Walle, W.H. Baricos, W. Cohen: *High Turnover NAD Regeneration in the Coupled Dehydrogenase Conversion of Sorbitol to Fructose*
in E.K. Pye, H.H. Weetall, eds., *Enzyme Engineering*, Vol. 3, 363-369, Plenum Press, New York (1978)
47. C.R. Gardner, C.K. Colton, R.S. Langer, B.K. Hamilton, M.C. Archer, G.M. Whitesides: *Enzymatic Regeneration of ATP from AMP and ADP : Part I. Thermodynamics, Kinetics, and Process Development*
in E.K. Pye, L.B. Wingard, eds., *Enzyme Engineering*, Vol. 2, 209-216, Plenum Press, New York (1975)
48. R.P. Chambers, J.R. Ford, J.H. Allender, W.H. Baricos, W. Cohen: *Continuous Processing with Cofactor Requiring Enzymes: Coenzyme Retention and Regeneration*
in E.K. Pye, L.B. Wingard, eds., *Enzyme Engineering*, Vol. 2, 195-202, Plenum Press, New York (1975)
49. Y. Yamazaki, H. Maeda, H. Suzuki: *Preparation of N(6)-(N-(6-Amino-hexyl)carbamoyl)-Adenine Nucleotides and Their Application to Coenzymically Active Immobilized ADP and ATP, and Affinity Adsorbents*
Eur. J. Biochem., 77, 511-520 (1977)
50. C. Wandrey, R. Wichmann, M.-R. Kula, A.F. Bückmann: *Enzym-Membran-Reaktor*
Umschau, 3, 88-91 (1984)

51. P. Zapelli, A. Rossodivita, L. Re: *Synthesis of Coenzymically Active Soluble und Insoluble Macromolecularized NAD Derivates*
Eur. J. Biochem., 52, 475-482 (1975)
52. P. Zapelli, A. Rossodivita, G. Prosperi, R. Pappa, L. Re: *New Coenzymically-Active Soluble and Insoluble Macromolecular NAD Derivates*
Eur. J. Biochem., 62, 211-215 (1976)
53. M. Mosbach: *Immobilized Coenzymes in General Ligand Affinity Chromatography and their Use as Active Coenzymes*
in A. Meister, ed., *Advances in Enzymology*, Vol.46, 205-278, Wiley-Interscience, New York (1978)
54. Y. Yamazaki, H. Maeda: *The Synthesis of New Polymer Derivates of ATP by Radical Copolymerization and Their Coenzymic Activity*
Agric. Biol. Chem., 45 (9), 2091-2103 (1981)
55. C. Wandrey, H. Haase, unveröffentlichte Ergebnisse
Institut für Biotechnologie, KFA Jülich (1984)
56. R.A. Cooper, H.L. Kornberg: *Phosphoenolpyruvate Synthetase*
in J.M. Lowenstein, ed., *Methods in Enzymology*, Vol. 13, 309-314, Academic Press, New York (1969)
57. H.J. Evans, H.G. Wood: *The Mechanism of the Pyruvate, Phosphate Dikinase Reaktion*
Proc. of the National Academy of Science, 61, 1448-1453 (1968)
58. B.L. Hirschbein, F.P. Mazenod, G.M. Whitesides: *Synthesis of Phosphoenolpyruvate and Its Use in Adenosine Triphosphate Cofactor Regeneration*
J. Org. Chem., 47 (19), 3765-3766 (1982)
59. D.L. Marshall: *ATP Regeneration Using Immobilized Carbamyl Phosphokinase*
in E.K. Pye, L.B. Wingard, eds., *Enzyme Engineering*, Vol. 2, 223-228, Plenum Press, New York (1975)
60. R.S. Langer, B.K. Hamilton, C.R. Gardner, M.C. Archer, C.K. Colton: *Enzymatic Regeneration of ATP. I. Alternative Routes*
AIChE J., 22 (6), 1079-1090 (1976)
61. M. Kiesling, persönliche Mitteilung
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig-Stöckheim (1984)
62. W.F. Blatt, B.G. Hudson, S.M. Robinson, E.M. Zipilivan
Anal. Biochem., 22, 161 (1968)

63. W. Leuchtenberger, Plenarvortrag
International Conference on Enzyme Engineering VII, White Haven,
Pennsylvania, USA, 25-30 September 1983
64. R.S. Mildvan: *Metals in Enzyme Catalysis*
in P.D. Boyer, ed., *The Enzymes. Kinetics and Mechanism*, Vol. 2,
445-536, Academic Press, New York (1970)
65. H.U. Bergmeyer: *Methoden der enzymatischen Analyse*
Verlag Chemie, Weinheim (1974)
66. G. Denda: *Zellfreie Glutathionsynthese*
Dissertation (in Vorbereitung), TU Braunschweig (1984)
67. Hewlett-Packard GmbH: *HP-41C Standard-Programmsammlung* 1980
68. R.S. Langer: *Enzymatic Regeneration of ATP*
Sc.D. Thesis, Mass. Inst. Technol., Cambridge (1974)
69. C.-Y. Lee, N.O. Kaplan: *Characteristics of 8-Substituted Adenine
Nucleotide Derivatives Utilized in Affinity Chromatography*
Arch. Biochem. Biophys., 168, 665-676 (1975)
70. C.-Y. Lee, L.H. Lazarus, D.S. Kabakoff, P.J. Russel Jr., M. Laver,
N.O. Kaplan: *Purification of Kinases by General Ligand Affinity
Chromatography*
Arch. Biochem. Biophys., 178, 8-18 (1977)
71. I.P. Trayer, H.R. Trayer, D.A.P. Small, R.C. Bottomley: *Preparation
of Adenosine Nucleotide Derivates Suitable for Affinity Chromato-
graphy*
Biochem. J., 139, 609-623 (1974)
72. Y. Yamazaki, H. Suzuki: *A New Method of Modification of N(6)- Amino
Group in Adenine Nucleotides with Formaldehyde and a Thiol and Its
Application to Preparing Immobilized ADP and ATP*
Eur. J. Biochem., 92, 197-207 (1978)
73. C.W. Fuller, H.J. Bright: *Covalent Immobilization of Soluble and
Enzymatically Active Adenine Nucleotide Coenzymes by a Single Step
Procedure*
J. Biol. Chem., 252 (19), 6631-6639 (1977)
74. F. Goffic, S. Sicsic, C. Vincent: *A Two-Step Synthesis of New Wa-
ter-Soluble Polymers of NAD and ADP. The Biological Properties of
These Polymers*
Eur. J. Biochem., 108, 143-148 (1980)

75. F. Goffic, S. Sicsic, C. Vincent: *A Simple, General Method for Preparation of Hydrosoluble Polymeric Adenine Nucleotide Coenzymes*
in H.H. Weetall, G.P. Royer, eds.,: *Enzyme Engineering*, Vol. 5,
127-131, Plenum Press, New York (1980)
76. A.F. Bückmann, M. Morr, M.-R. Kula: *Synthesis of Water Soluble Polymers with Covalently Bound General Ligands*
in G. Broun, G. Manecke, L.B. Wingard, eds.,: *Enzyme Engineering*
Vol. 4, 395-397, Plenum Press, New York (1978)
77. A.F. Bückmann, M. Morr, G. Johanson: *Functionalisation of Poly- (ethylene glycol) and Monomethoxy-Poly(ethylene glycol)*
Macromolecular Chemistry, 182, 1379-1384 (1981)
78. M.D. Mansson, P.O. Larsson, K. Mosbach: *Recycling by a Second Enzyme of NAD Covalently Bound to Alcohol Dehydrogenase*
FEBS Lett., 98, 309-313 (1979)
79. C.R. Lowe: *Immobilized Coenzymes*
Trends Biochem. Sci., 3 (6), 134-137 (1978)
80. Y. Sakaguchi, T. Murachi: *Synthesis and Coenzyme Activity of Water-Soluble, High-Molecular-Weight NAD Derivates Covalently Bound to Dextran T 70*
J. Appl. Biochem., 2, 117-129 (1980)
81. M. Morr, persönliche Mitteilung
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig-Stöckheim (1983)
82. M. Papamichael, persönliche Mitteilung
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig-Stöckheim (1984)
83. H.P. Schwefel: *Numerische Optimierung von Computermodellen mittels der Evolutionsstrategie*
Birkhäuser, Basel (1977)
84. R.K. Bajpai, persönliche Mitteilung
Institut für Fermentation und Brauwesen, Berlin (1980)
85. D.P.N. Satchell, G.F. White: *Kinetic Studies with Acetate Kinase*
Biochim. Biophys. Acta, 212, 248-256 (1970)
86. R.S. Anthony, L.B. Spector: *Exchange Reactions Catalyzed by Acetate Kinase*
J. Biol. Chem., 246 (20), 6129-6135 (1971)

87. C.A. Janson, W.W. Cleland: *The Inhibition of Acetate, Pyruvate, and 3-Phosphoglycerate Kinases by Chromium Adenosine Triphosphate*
J. Biol. Chem., 249 (8), 2567-2571 (1974)
88. P.J. Romaniuk, F. Eckstein: *Structure of the Metal-Nucleotide Complex in the Acetate Kinase Reaktion*
J. Biol. Chem., 256 (14), 7322-7328 (1981)
89. R.S. Langer, C.R. Gardner, B.K. Hamilton, C.K. Colton: *Enzymatic Regeneration of ATP. II. Equilibrium Studies with Acetate Kinase and Adenylate Kinase*
AIChE J., 23 (1), 1-10 (1977)
90. E.A. Robbins, P.D. Boyer
J. Biol. Chem., 224, 121 (1957)
91. G.G. Hammes, D. Kochavi: *Studies of the Enzyme Hexokinase. II. Kinetic Inhibition by Products*
J. Am. Chem. Soc., 84, 2073-2079 (1962)
92. M.I. Nemet: *Kinetic Studies on a Coupled Enzyme System for the Regeneration of ATP*
Sc.D. Thesis, Mass. Inst. Technol., Cambridge (1976)
93. S.P. Colowick: *The Hexokinases*
in P.D. Boyer: *The Enzymes*, Vol. IX, Academic Press, New York (1973)
94. W.S. Lin, D.A. Armstrong: *Effects of Superoxide Dismutase, Dithiothreitol and Formate Ion on the Inactivation of Papain by Hydroxyl and Superoxide Radicals in Aerated Solutions*
Int. J. Radiat. Biol., 33, 231-243 (1978)
95. D.A. Armstrong, J.D. Buchanan: *Reaktionen of O₂, H₂O₂ and Other Oxidants with Sulfhydryl Enzymes*
Photochem. Photobiol., 28, 743-755 (1978)
96. I.V. Berezin, A.M. Klivanov, G.P. Samokhin, K. Martinek
Meth. Enzymol., 44, 558 (1976)
97. L. Jandel: *Rechnerunterstützte Optimierung eines Enzym-Membran-Reaktors zur kontinuierlichen Produktion von L-Aminosäuren*
Dissertation, TU Clausthal (1981)
98. H. Kleinkauf, H. Koischwitz: *Peptide Bond Formation in Non-ribosomal Systems*
in F.E. Hahn, ed., *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, Vol. 6, 59-112, Springer, Berlin (1978)

99. K. Imahori: *Preparation of ATP-Regenerating Enzymes*
Patent, Japan Kokai Tokkyo Koho, 56-99792 (1981)
100. L.G. Ljungdahl, D.W. Sherod, M.R. Moore, J.R. Andreessen: *Properties of Enzymes from Clostridium Thermoaceticum and Clostridium Formicoaceticum*
in H. Zuber, ed., *Enzymes and Proteins from Thermophilic Microorganisms*, 237-248, Birkhäuser, Basel (1976)
101. B. Meier: *Superoxid-Dismutase aus Propionibacterium*
Diplomarbeit, Universität Bonn (1979)
102. G.M. Whitesides, M. Siegel, P. Garrett: *Large-Scale Synthesis of Diammonium Acetyl Phosphate*
J. Org. Chem., 40 (17), 2516-2519 (1975)
103. E. Siefert, M.-R. Kula, persönliche Mitteilung
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig-Stöckheim (1984)

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Februar 1981 bis Mai 1984 am Institut für Biotechnologie 2 (IBT 2) der Kernforschungsanlage Jülich GmbH angefertigt.

Herrn Prof. Dr.-Ing M. Reuß, Institut für Fermentation und Brauwesen der Technischen Universität Berlin, danke ich für die Übernahme des Hauptreferates.

Herrn Prof. Dr. C. Wandrey, IBT 2 der KFA Jülich, danke ich für die Übernahme des Korreferates und für die Betreuung der Arbeit.

Den Mitarbeitern der Abteilung für hochmolekulare Naturstoffe der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig-Stöckheim, gilt mein Dank für die geleistete Unterstützung und die Zusammenarbeit. Herr Dr. M. Morr hat mit seinen Synthesen der ATP-Derivate die Voraussetzung für diese Arbeit geschaffen. Frau Dipl. Ing. G. Denda danke ich für die Zusammenarbeit bei der kontinuierlichen γ -Glutamyl-Cystein Synthese.

Ebenso danke ich Frau cand. chem. E. Schmidt und Herrn cand. chem. U. Gieseke, die einen Beitrag zu den analytischen Untersuchungen und zur Auswertung der Messungen geleistet haben.

Meinem Bruder Dipl. Ing. J. Berke gilt mein Dank für die Ausführung der Graphiken, Frau K. Bräker und Herrn S. Peters danke ich für die Gestaltung der Fotografien.

Ebenso danke ich Frau I. Nagel, Zentralinstitut für angewandte Mathematik, die mich in Fragen der Textverarbeitung unterstützt hat.

Außerdem danke ich allen Institutsangehörigen, insbesondere den Mitarbeitern der mechanischen Werkstatt, die diese Arbeit bereitwillig unterstützt haben.

